

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 décembre 2005 (15.12.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/118817 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/62, C12Q 1/68,
C12N 15/63, 15/12, 5/10, G01N 33/68

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/001288

(22) Date de dépôt international : 24 mai 2005 (24.05.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0405753 27 mai 2004 (27.05.2004) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **OBE
THERAPY BIOTECHNOLOGY** [FR/FR]; 4 rue Pierre
Fontaine, F-91000 Evry (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **GAUDRI-
AULT, Georges** [FR/FR]; 23 rue de Picpus, F-75012 Paris
(FR). **SENAC, David** [FR/FR]; 80 avenue Ledru-Rollin,
F-75012 Paris (FR). **MOUGIN, Christelle** [FR/FR]; 78
rue de la Villette, F-75019 Paris (FR). **HAROSH, Itzik**
[IL/FR]; 21 rue des Cordelières, F-75013 Paris (FR).

(74) Mandataires : **DESAIX, Anne** etc.; Ernest Gutmann-
Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008
Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR HIGH SPEED SCREENING FOR THE IDENTIFICATION OF MOLECULES INHIBITING THE
ACTIVITY OF EDITING ENZYMES

(54) Titre : PROCEDE DE CRIBLAGE A HAUT DEBIT POUR L'IDENTIFICATION DE MOLECULES INHIBITRICES DE
L'ACTIVITE D'ENZYMES D'EDITION

(57) Abstract: The invention relates to a method for high speed screening for the identification of inhibitors of the activity of editing
enzymes such as Apobec-1 or the like, and means for implementing said method. The invention especially relates to an appropri-
ate recombinant construction for screening molecules inhibiting the activity of editing enzymes, comprising an open reading phase
containing, in translational fusion, a sequence coding for a signal peptide, a sequence coding for a reporter polypeptide, a sequence
that can be edited by an editing enzyme, and a sequence coding for a transmembrane domain. When the protein is translated from
a non-edited RNA messenger, the resulting chimeric protein is anchored to the plasmic membrane of the cell. When it is translated
from an edited RNA messenger, it is secreted.

(57) Abrégé : La présente invention porte sur un procédé de criblage à haut débit pour l'identification d'inhibiteurs de l'activité
d'enzymes d'édition telles que Apobec-1 ou ses analogues et les moyens pour sa mise en oeuvre. Elle porte en particulier sur une
construction recombinante appropriée pour le criblage de molécules inhibitrices de l'activité d'enzymes d'édition, comprenant une
phase ouverte de lecture contenant en fusion traductionnelle : une séquence codant un peptide signal, une séquence codant un
polypeptide rapporteur, une séquence susceptible d'être éditée par une enzyme d'édition et une séquence codant un domaine trans-
membranaire. Lorsqu'elle est traduite d'un ARN messager non édité, la protéine chimérique qui en résulte est ancrée à la membrane
plasmique de la cellule. Lorsqu'elle est traduite d'un ARN messager édité, elle est sécrétée.



WO 2005/118817 A1

**PROCEDE DE CRIBLAGE A HAUT DEBIT POUR
L'IDENTIFICATION DE MOLECULES INHIBITRICES
DE L'ACTIVITE D'ENZYMES D'EDITION**

La présente invention porte sur un procédé de criblage à haut débit pour
5 l'identification d'inhibiteurs de l'activité d'enzymes d'édition telles que
Apobec-1 ou ses analogues et les moyens pour sa mise en œuvre. Elle
porte en particulier sur une construction recombinante appropriée pour le
criblage de molécules inhibitrices de l'activité d'enzymes d'édition,
comprenant une phase ouverte de lecture contenant en fusion
10 traductionnelle : une séquence codant un peptide signal, une séquence
codant un polypeptide rapporteur, une séquence susceptible d'être éditée
par une enzyme d'édition et une séquence codant un domaine
transmembranaire. Lorsqu'elle est traduite d'un ARN messenger non édité,
la protéine chimérique qui en résulte est ancrée à la membrane plasmique
15 de la cellule. Lorsqu'elle est traduite d'un ARN messenger édité, elle est
sécrétée.

Les cas d'obésité sont en perpétuelle croissance dans tous les pays et
contribuent à l'explosion des dépenses de santé. En Europe, plus de 15%
de la population est obèse et aux Etats-Unis la proportion s'élève à près de
20 30% de la population (50% si l'on inclut les personnes en surcharge
pondérale). L'international Obesity Task Force en collaboration avec
l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'il y a plus de 250
millions de personnes obèses dans le monde et prévoit que ce chiffre
augmente dramatiquement dans les années à venir aussi bien dans les
25 pays développés que dans les pays en voie de développement. Du point de
vue économique, les coûts directs et indirects liés à l'obésité représentent
environ 10% du budget mondial pour la santé. Aux Etats-Unis, par
exemple, les dépenses totales liées à l'obésité correspondent à plus de 100
milliards de dollars ; les dépenses directes (52 milliards de dollars)
30 représentent 6% des dépenses de santé du gouvernement américain. À

l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement qui soit vraiment efficace et sans effets secondaires incommodants.

5 L'obésité est considérée comme une pathologie qui se caractérise par la persistance d'un déséquilibre énergétique positif, les apports énergétiques étant supérieurs aux dépenses énergétiques. Il en résulte alors une surcharge pondérale qui peut être chronique selon la sévérité de l'obésité. Bien que les causes réelles de la maladie restent encore inconnues, certaines données médicales et scientifiques suggèrent que l'obésité est plurifactorielle. Elle résulterait de l'âge, de facteurs environnementaux et/ou socioculturels et d'un dysfonctionnement des médiateurs contrôlant la
10 régulation du métabolisme. De plus, une prédisposition génétique peut également favoriser la survenue de la maladie.

Certains ARN messagers spécifiques sont modifiés selon un mécanisme enzymatique cellulaire connu sous le nom d'édition (pour revue, voir Gott et
15 Emeson, *Annu. Rev. Genet.*, 2000, **34** : 499-531). En particulier, l'édition peut consister en la substitution d'un nucléotide particulier d'un ARN messager par un autre nucléotide, en particulier une cytidine par une uridine, ou en l'insertion ou la suppression d'un ou plusieurs nucléotides. Lorsque la cytidine est située dans un codon CAA, la substitution par un
20 uridine conduit à la formation d'un codon stop. Le gène apoB est un exemple de gène dont l'ARN messager est modifié par un tel processus d'édition.

Le gène apoB code pour deux protéines, apoB100 et apoB48. Ces deux protéines sont traduites à partir du même ARN messager. L'ARN messager
25 de apoB est en effet susceptible d'être modifié par une enzyme d'édition nommée Apobec-1 par remplacement de la cytidine correspondant au nucléotide 6666 de la séquence humaine de l'ARNm apoB, par un uridine, créant un codon stop.

Dans le système digestif de l'homme, l'enzyme d'édition Apobec-1 est exprimée dans l'intestin mais pas dans le foie. Dans l'intestin, l'ARN messager est édité, ce qui aboutit à la production du polypeptide apoB48. ApoB48 est essentielle pour la formation des chylomicrons, qui servent à l'absorption et au transport du cholestérol, des triglycérides et autres lipides en provenance de l'intestin. Dans le foie, où l'enzyme Apobec-1 n'est pas exprimée, et où aucune édition de l'ARN messager d'apoB n'a lieu, la protéine produite est apoB100, une lipoprotéine de très faible densité (VLDL, Very Low Density Lipoproteins) et de faible densité (LDL, Low Density Lipoproteins).

L'analyse de patients atteints de maladies monogéniques associées à un phénotype maigre dû à un défaut d'absorption des lipides a conduit à proposer une nouvelle approche pour le traitement de l'obésité fondée sur l'utilisation de molécules inhibitrices de l'activité d'édition de Apobec-1 pour le traitement de l'athérosclérose et de l'obésité ou tout autre maladie caractérisée notamment par un niveau de chylomicrons et/ou de VLDL élevé. Cette approche a été décrite en détail dans le brevet français FR97 16655, délivré en mai 2002.

La mise en œuvre de cette méthode de traitement nécessite l'identification de molécules inhibitrices ayant pour cible spécifique l'activité de l'enzyme responsable de l'édition du gène apoB, Apobec-1.

Le brevet FR97 04388 décrit une méthode de détection de déamination d'une cytidine dans un ARN. La méthode est fondée sur la méthode par extension d'amorces comprenant l'incorporation de nucléotides marqués par transcription inverse. Selon la structure éditée ou non éditée de l'ARN matrice, le nombre de nucléotides marqués incorporés varie et ce nombre peut être mesuré par détection des nucléotides marqués. Sur le même principe, il est possible d'arrêter l'extension par incorporation de didéoxyguanine à la place de la guanine, selon la méthode décrite notamment par Davies *et al.* (*J Biol Chem*, 1989, 264(23) : 13395-13398).

Ces méthodes, toutes basées sur la mise en évidence d'une modification des séquences de l'ARN messager ne sont pas quantitatives et s'avèrent peu adaptées pour détecter une modulation de l'activité de l'enzyme Apobec-1. En outre, elles sont coûteuses en matériel et en main d'œuvre, et requièrent en général l'utilisation d'une source de radioactivité.

Il existe donc un réel besoin de mettre au point un procédé de criblage à haut débit qui permette de mesurer l'activité d'édition de l'enzyme Apobec-1 afin d'identifier des molécules inhibitrices, potentiellement d'intérêt pour le traitement de l'athérosclérose, de l'obésité et/ou du diabète. Un tel procédé doit être facile à mettre en œuvre et doit permettre une mesure précise, rapide et spécifique de l'activité de l'enzyme Apobec-1.

La solution proposée par la présente invention consiste à exprimer un gène comprenant une séquence codant en fusion traductionnelle un peptide signal, un polypeptide rapporteur fusionné à une zone d'édition optimale d'une enzyme d'édition, telle que l'enzyme Apobec-1, par exemple la zone d'édition d'apoB et un domaine transmembranaire d'ancrage à la membrane plasmique (figure 1). Dans le cas où l'édition entraîne la formation d'un codon stop ou un décalage de phase, la protéine chimérique traduite à partir de l'ARN non édité est ancrée à la membrane plasmique, via son domaine transmembranaire, au contraire, la protéine chimérique synthétisée à partir de l'ARN édité, est dépourvue du domaine transmembranaire et sécrétée dans le milieu extracellulaire grâce à la présence du peptide signal. A l'inverse, dans le cas où l'édition entraîne la suppression d'un codon stop et le rétablissement d'une phase codante, la protéine chimérique traduite à partir de l'ARN édité reste ancrée à la membrane plasmique, via son domaine transmembranaire, au contraire, la protéine chimérique synthétisée à partir de l'ARN non édité, est dépourvue du domaine transmembranaire et sécrétée dans le milieu extracellulaire grâce à la présence du peptide signal.

Ainsi, quel que soit le mécanisme d'édition étudié, il suffit donc de doser la quantité de protéine chimérique sécrétée dans le milieu au moyen du polypeptide rapporteur pour déterminer la quantité d'ARN édité.

5 Ainsi, l'invention porte notamment sur une construction recombinante appropriée permettant l'expression d'une protéine chimérique dans les conditions décrites ci-dessus.

En particulier, l'invention porte sur un acide nucléique approprié pour le criblage de molécules inhibitrices de l'activité d'une enzyme d'édition, notamment de l'enzyme Apobec-1 ou d'un analogue de Apobec-1, comprenant une phase ouverte de lecture comprenant au moins les
10 éléments suivants dans le sens 5'-3' :

- a) une séquence codant un peptide signal permettant l'adressage extracellulaire d'un polypeptide auquel ledit peptide signal est fusionné,
- b) une séquence codant un polypeptide rapporteur, en phase avec la
15 séquence du peptide signal,
- c) un site d'édition comprenant un codon éditable en phase avec la séquence codante du polypeptide rapporteur défini en b., ledit site d'édition étant choisi parmi les séquences susceptibles d'être éditées par une enzyme d'édition, soit par substitution d'un nucléotide situé au niveau d'un
20 codon par un autre nucléotide pour former un codon stop, soit par insertion ou suppression d'un nucléotide dans la phase codante conduisant à un décalage de phase, soit par substitution d'un nucléotide situé au niveau d'un codon stop par un autre nucléotide pour former un codon codant.

Ledit acide nucléique ou construction recombinante constitue un moyen
25 pour la mise en œuvre de la méthode de criblage d'inhibiteurs d'une enzyme d'édition, notamment Apobec-1 ou l'un de ses analogues, telle que détaillée ci-après.

Le terme « acide nucléique » signifie au sens de l'invention, sauf précision spécifique, un polymère de nucléotides comprenant au moins 50 nucléotides, simple brin ou double brin, ADN ou ARN notamment. En tout état de cause, il s'agit d'une séquence isolée de son environnement naturel, et notamment du corps humain ou animal.

Au sens de l'invention, on entend par Apobec-1, l'enzyme responsable de l'édition du gène apoB chez l'homme et dont le gène a été décrit par Fujino et al., 1998, Genomics, 47 :266-275 ; Hirano et al., 1997, J Lipid Res, 38 :847-859.

Au sens de l'invention, on considèrera comme « enzyme d'édition », toute enzyme capable d'éditer un ARN messager, soit par substitution d'un nucléotide situé au niveau d'un codon par un autre nucléotide pour former un codon stop, soit par insertion ou suppression d'un nucléotide dans la phase codante conduisant à un décalage de phase, soit par substitution d'un nucléotide situé au niveau d'un codon stop par un autre nucléotide pour former un codon codant.

Différentes enzymes d'édition ont été décrites dans l'état de la technique et sont notamment décrites par Gott et Emeson (Annu. Rev. Genet. 2000, 34 : 499-531).

Plus particulièrement, on considèrera comme « analogue de Apobec-1 », toute enzyme d'édition capable de substituer une cytidine au niveau d'un codon CAA par un uridine pour former le codon stop UAA. Un analogue de Apobec-1 peut comporter des homologies de structure avec l'enzyme Apobec-1, il s'agit alors d'homologues fonctionnels de Apobec-1. Il peut aussi comporter une structure radicalement différente.

Des analogues de Apobec-1 ont été décrits dans l'état de la technique, notamment dans les demandes de brevets EP 1 174 509 A1, US 5,747,319 et US 5,804,185.

On entend par « phase ouverte de lecture », une séquence d'acide nucléique susceptible d'être traduite, le cas échéant après transcription et maturation des ARN messagers correspondants, et commençant par un codon ATG à l'extrémité 5' de la phase ouverte de lecture (AUG dans le cas d'une séquence d'ARN) et se terminant par un codon stop TAA, TAG ou TGA (UAA, UAG ou UGA dans le cas d'une séquence d'ARN) à l'extrémité 3'.

Le peptide signal

Un premier élément de la construction recombinante selon l'invention concerne la séquence codant le peptide signal. La séquence codant le peptide signal doit être placée à l'extrémité 5' de la construction de sorte que le peptide signal se situe à l'extrémité N-terminale de la protéine chimérique correspondante. Classiquement, la séquence du peptide signal est une séquence de 15 à 20 acides aminés, riche en acides aminés hydrophobes (Phe, Leu, Ile, Met et Val). Le peptide signal selon l'invention a pour fonction de rediriger l'adressage d'un polypeptide hétérologue auquel il est fusionné vers les vésicules de sécrétion, et de permettre la sécrétion dudit polypeptide, dès lors que ce polypeptide est dépourvu de domaine transmembranaire.

L'homme du métier choisira de préférence, le peptide signal en fonction de l'hôte cellulaire dans lequel l'acide nucléique sera introduit. Dans un mode de réalisation spécifique, le peptide signal est un peptide issu d'un polypeptide exprimé dans une cellule de mammifère.

A titre d'exemples de peptide signal utilisable, on citera en particulier le peptide SS, l'hormone de croissance, l'activateur du plasminogène tissulaire, l'interleukine-2, la chaîne κ des immunoglobulines, l'alkaline phosphatase, l'haemaglutinine d'Influenza.

Le polypeptide rapporteur

Un autre élément de la construction recombinante selon l'invention concerne la séquence codant le polypeptide rapporteur.

5 On entend par polypeptide « rapporteur », un polypeptide qui peut être aisément détecté et quantifié du fait de sa structure ou de ses propriétés particulières. Dans un mode de réalisation particulier, le polypeptide rapporteur est codé par une séquence qui n'est pas naturellement associée à un site d'édition (séquence hétérologue).

10 Par exemple, un tel polypeptide est une enzyme dont l'activité peut être aisément détectée, par détection de la quantité de produit résultant de la réaction catalytique. Elle peut également être une protéine fluorescente. Cela peut également être un antigène reconnu spécifiquement par un anticorps ou de manière générale, tout peptide ou polypeptide capable d'être reconnu par un ligand spécifique. Le ligand correspondant peut alors
15 être marqué par tout marquage approprié, par exemple un marquage radioactif ou fluorescent et la liaison ligand-polypeptide rapporteur est détectée aisément par des moyens appropriés.

L'homme du métier sélectionnera la séquence du polypeptide rapporteur de son choix. De préférence, la longueur de la séquence codant le polypeptide
20 rapporteur est comprise entre 100 et 4000 pb, et mieux entre 500 et 1 000 pb.

A titre d'exemples de séquences de polypeptide rapporteur, on citera en particulier l'EGFP, la luciférase du ver luisant, la luciférase de *renilla*, la luciférase de *vargula*, la β -lactamase (TEM-1), la β -Galactosidase, la
25 phosphatase alcaline sécrétée (SEAP), la chloramphenicol acétyltransferase (CAT), la β -glucuronidase. En ce qui concerne la luciférase de *vargula* et la SEAP, ces rapporteurs sont naturellement sécrétés et ne nécessitent donc pas l'ajout d'un peptide signal hétérologue.

La séquence du polypeptide rapporteur est choisie de préférence dans le groupe constitué des rapporteurs EGFP, β -lactamase et luciférase. Le polypeptide EGFP peut être quantifié par mesure de la fluorescence émise directement par ce polypeptide à l'aide d'un spectrofluoromètre comme décrit par exemple dans Laukkanen *et al.*, 1996, *Biochem Biophys Res Commun.* 226 : 755-61 ; Pol *et al.*, 2002, *J Biomol Screen* 7 : 325-32. L'activité β -lactamase peut être mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre ou un spectrofluoromètre comme décrit par exemple dans Bebrone *et al.*, 2001, *Antimicrob Agents Chemother* 45 : 1868-71 et Moore *et al.*, 1997, *Anal Biochem* 247 : 203-9. L'activité luciférase peut être mesurée à l'aide d'un luminomètre utilisant la luciférine et l'ATP comme décrit par exemple dans Pouli *et al.*, 1998, *Biochem J* 331 : 669-675.

Le site d'édition

Un élément essentiel de l'acide nucléique selon l'invention est le site d'édition tel que défini au point c). Par « site d'édition », on entend toute séquence contenant les éléments nécessaires pour l'édition d'un ARN messenger, soit par substitution d'un nucléotide situé au niveau d'un codon par un autre nucléotide pour former un codon stop, soit par insertion ou suppression d'un nucléotide dans la phase codante conduisant à un décalage de phase, soit par substitution d'un nucléotide situé au niveau d'un codon stop par un autre nucléotide pour former un codon codant.

De préférence, le site d'édition comprend les éléments nécessaires à la substitution d'une cytidine d'un codon CAA par un uridine pour former le codon stop UAA, lorsque ladite séquence est exprimée sous la forme d'un ARN messenger dans une cellule exprimant une enzyme d'édition appropriée, telle que Apobec-1 ou l'un de ses analogues. Ainsi, un tel site d'édition comprend nécessairement au moins le codon éditable, par exemple, CAA, mais également des séquences directement adjacentes nécessaires à l'édition.

Des sites d'édition introduisant un codon stop ont été identifiés sur des gènes d'organismes eucaryotes et notamment le gène apoB, le gène NAT1 (Genes Dev. 11:321-33, 1997), le gène de la neurofibromatose de type 1 (Am. J. Hum. Genet. 70:38-50, 2002; Trends Genet. 12: 418-424, 1996) et la gène vpr de HIV (*Science* **289** : 1564-6, 2000).

Des sites d'édition rétablissant une phase de lecture ont été également identifiés et notamment le gène de l'antigène du virus de l'hépatite delta (Nature 380: 454-456, 1996).

En particulier, la région impliquée dans l'édition de l'ARNm apoB a été caractérisée par Driscoll *et al.*, 1993, *Mol Cell Biol*, 13(12), 7288-7284 et Davies *et al.* 1989, *J Biol Chem*, 264(23) : 13395-13398.

De préférence, on utilisera la séquence du site d'édition de apoB chez l'homme. La séquence du gène apoB chez l'homme est accessible dans la base GenBank sous le numéro NM_00384 et décrite à la figure 8. Dans le texte qui suit, les positions des nucléotides du site d'édition de apoB sont indiquées par référence à la séquence de apoB décrite à la figure 8.

Dans un mode de réalisation spécifique, le site d'édition est une région de la phase codante du gène apoB, éditable par l'enzyme Apobec-1, de préférence une région comprenant les nucléotides 6666 à 6681 de la séquence de apoB, et de manière encore plus préférée une région comprenant les nucléotides 6645 à 6703, ou encore une région ayant au moins 60% d'identité avec la région d'édition de la phase codante de apoB constitués des nucléotides 6648 à 6681, de préférence 70% d'identité avec cette dernière, voire 80% d'identité, et conservant la propriété d'être éditable par l'enzyme Apobec-1.

La séquence du site d'édition peut être choisie parmi les séquences des gènes apoB de mammifère et en particulier des gènes apoB humain, du chien, de la souris, du porc, du rat, du chat, du cheval, du mouton ou du

lapin. Les séquences du site d'édition de ces gènes ont été décrites plus particulièrement à la figure 2 de l'article de Chester *et al.*, 2000, BBA, 1-13, dont le contenu est incorporé par référence.

5 A titre d'exemple, le site d'édition comprend la région codante de apoB constituée des nucléotides 6507 à 6860 de la séquence de apoB.

La région transmembranaire

10 Un autre élément de l'acide nucléique selon l'invention concerne la séquence codant la région transmembranaire, située en 5' du site d'édition. On entend par « région transmembranaire », un domaine polypeptidique permettant l'ancrage d'un polypeptide auquel il est fusionné à la membrane plasmique. De préférence, l'origine de la séquence codant le domaine transmembranaire choisi dépendra de l'hôte cellulaire dans lequel l'acide nucléique sera introduit. Par exemple, le domaine transmembranaire peut être issu d'une protéine exprimée dans une cellule de mammifère. Le
15 domaine transmembranaire peut en particulier être choisi dans le groupe constitué :

- du domaine transmembranaire du récepteur humain de la transferrine,
- du domaine transmembranaire de la chaîne B du récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes humain (PDGFR),
- 20 - du domaine transmembranaire B7-1 de souris (B7), ou encore
- du domaine transmembranaire de type II de la sous-unité H1 du récepteur de l'asialoglycoprotéine (ASGPR).

25 Les différents éléments détaillés ci-dessus forment la phase ouverte de lecture de l'acide nucléique selon l'invention, codant, dans sa forme non éditée, pour une protéine chimérique comprenant, de l'extrémité N-terminale à la partie C-terminale, un peptide signal, un polypeptide rapporteur et un domaine transmembranaire. Le site d'édition est inséré

entre la séquence du polypeptide rapporteur et la séquence du domaine transmembranaire. Dans un mode de réalisation préféré, la phase codante de l'acide nucléique est essentiellement constituée des éléments définis ci-dessus, peptide signal, polypeptide rapporteur, site d'édition et domaine transmembranaire. Elle peut comprendre en plus, le cas échéant, une séquence appropriée pour la reconnaissance de la protéine chimérique, sa quantification et/ou sa purification, et notamment une séquence d'un épitope.

Pour simplifier la lecture, sauf précision spécifique, dans le texte qui suit, par « phase ouverte de lecture codant la protéine chimérique », on fera référence à la phase ouverte de lecture de l'acide nucléique selon l'invention telle que définie ci-dessus.

L'acide nucléique selon l'invention peut comprendre en outre les éléments nécessaires à l'expression de ladite phase ouverte de lecture codant une protéine chimérique dans une cellule hôte et en particulier les éléments de contrôle de la transcription et de la traduction de la phase codante, tels que les promoteurs, les séquences activatrices, les séquences terminatrices.

Un promoteur est une séquence régulatrice de l'ADN située en amont de la phase codante et qui permet de fixer l'ARN polymérase d'une cellule pour initier la transcription du gène en ARN messager. Parmi les exemples de promoteurs utilisables, on citera en particulier les promoteurs de cellules eucaryotes, et de préférence de cellules de mammifères, les promoteurs dérivés de virus (comme par exemple les promoteurs CMV, SV40 et RSV), de rétrovirus ou de protéines de choc thermique. Naturellement, là encore, on choisira le promoteur en fonction de la cellule dans laquelle la construction doit être introduite. Il s'agit de préférence de promoteurs forts constitutifs de cellules de mammifère tels que le promoteur du CMV ou tout autre promoteur permettant un niveau d'expression au moins équivalent au promoteur du CMV. Le niveau d'expression doit être suffisant pour détecter l'activité du rapporteur. Un rapporteur très sensible pourra être associé

avec un promoteur faible et inversement un rapporteur peu sensible devra être associé avec un promoteur fort (du type CMV).

L'invention vise en outre un vecteur comprenant :

- 5 (i) un acide nucléique ou construction recombinante approprié pour le criblage de molécules inhibitrices de l'activité d'une enzyme d'édition, notamment de Apobec-1 ou de l'un de ses analogues, comme défini ci-dessus, et
- (ii) les séquences permettant l'expression de la phase ouverte de lecture codant la protéine chimérique, dans une cellule hôte appropriée.

10 Le vecteur d'expression est choisi en fonction de la cellule hôte dans laquelle la construction est introduite. De préférence, il est choisi parmi les vecteurs d'expression de cellules de mammifères en vue de son introduction dans une cellule hôte de mammifère. Un vecteur selon l'invention peut comprendre en outre les éléments suivants : une séquence
15 de réplication dans une cellule procaryote, par exemple, *E. coli*, un marqueur de sélection d'une cellule procaryote et un marqueur de sélection d'une cellule eucaryote, en particulier d'une cellule de mammifère, tel que le marqueur de résistance à la généticine ou à l'hygromycine. Il peut comprendre en outre une région comprenant une combinaison de sites
20 d'enzymes de restriction permettant le clonage de molécules d'acides nucléiques.

Un exemple de vecteur d'expression comprenant un acide nucléique selon l'invention est le vecteur pDisplay contenant l'insert tel que décrit dans la partie expérimentale ci-après.

25 Une fois le vecteur d'expression construit, l'homme du métier peut utiliser toutes techniques appropriées connues de l'état de la technique pour l'amplifier.

Le vecteur d'expression ou l'acide nucléique selon l'invention est ensuite introduit dans une cellule hôte appropriée pour permettre l'expression de la phase ouverte de lecture codant la protéine chimérique. La cellule hôte est sélectionnée de préférence parmi les cellules hôtes eucaryotes, de
5 préférence de mammifère, et de manière encore préférée de l'homme. Des exemples de cellules hôtes sont en particulier les lignées cellulaires CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, HepG2 ou L(TK⁻), la lignée humaine Caco-2 et la lignée murine MacArdleRH777 ; de préférence il s'agit de la lignée HepG2.

10 L'invention vise en conséquence les cellules hôtes ainsi obtenues après transformation.

Dans un mode de réalisation préféré, la cellule hôte comprend :

- (i) un acide nucléique selon l'invention approprié pour le criblage d'inhibiteurs d'une enzyme d'édition, notamment de Apobec-1 ou de l'un de ses analogues; et,
- 15 (ii) une séquence permettant la synthèse d'une enzyme d'édition fonctionnelle, notamment une enzyme Apobec-1 ou l'un de ses analogues, susceptible d'éditer la phase ouverte de lecture codant la protéine chimérique.

De préférence, ladite séquence permet une expression forte du gène
20 codant l'enzyme d'édition, notamment Apobec-1 ou l'un de ses analogues. La séquence codant l'enzyme d'édition, notamment Apobec-1 ou l'un de ses analogues, peut par exemple être placée sous contrôle d'un promoteur fort, par exemple le promoteur du CMV ou un promoteur permettant un niveau d'expression du gène placé en aval au moins identique.

25 De préférence, la séquence permettant la synthèse de l'enzyme d'édition est introduite de manière stable dans le génome d'une cellule hôte eucaryote, de manière préférée d'une cellule de mammifère, et mieux d'une cellule humaine. La transfection stable des cellules est réalisée par les

techniques classiques connues de l'homme du métier, par exemple décrites dans Sambrook *et al.* (2001, « *Molecular Cloning : A laboratory manual* », 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York), en utilisant notamment des marqueurs de sélection appropriés tels que le marqueur de résistance à la généticine ou le marqueur de résistance à l'hygromycine.

On obtient ainsi une cellule exprimant l'enzyme d'édition et la protéine chimérique. Selon l'activité de l'enzyme d'édition, ladite protéine chimérique est sécrétée ou est ancrée dans la membrane plasmique via son domaine transmembranaire.

L'invention vise ainsi une méthode de criblage d'inhibiteurs de l'activité de l'enzyme d'édition, notamment de Apobec-1 ou d'un analogue de Apobec-1, ladite méthode comprenant :

- a) la culture d'une cellule telle que définie ci-dessus, dans des conditions appropriées pour la synthèse de l'enzyme d'édition et d'une protéine chimérique comprenant au moins le peptide signal et le polypeptide rapporteur, tels que définis plus haut, en présence ou en absence d'un composé candidat,
- b) la mesure de la quantité de protéines chimériques sécrétées dans le milieu de culture, en présence ou en absence du composé candidat,
- c) le cas échéant, la mesure de la quantité de protéines chimériques ancrées à la membrane cellulaire par le domaine transmembranaire, en présence ou en absence du composé candidat,
- d) la mise en évidence d'une variation de la quantité relative de protéines chimériques sécrétées en présence du composé candidat, par rapport à la quantité relative de protéines chimériques sécrétées en absence du composé candidat, indiquant que ledit composé candidat est un inhibiteur de l'activité d'édition de l'enzyme d'édition, notamment de Apobec-1 ou de l'un de ses analogues.

Par « quantité relative », il faut comprendre que la quantité absolue de protéines chimériques sécrétées par cellule est rapportée à la quantité absolue de protéines chimériques sécrétées par une cellule « contrôle » ; ladite cellule « contrôle » étant caractérisée en ce qu'elle comprend un
5 acide nucléique identique à l'acide nucléique éditable à l'exception du site d'édition qui comprend le codon sous sa forme éditée, à la place du codon éditable, par exemple un codon stop TAA dans le cas de l'utilisation de Apobec-1 ou l'un de ses analogues. Une cellule exprimant un tel acide nucléique contrôle permet d'évaluer le niveau de synthèse équivalent à une
10 activité optimale de l'enzyme d'édition, soit 100% d'édition.

Bien entendu, tout autre type de contrôle pourra être utilisé dès lors qu'il permet de confirmer que la diminution ou l'augmentation de la quantité de protéines chimériques sécrétées est bien corrélée à une diminution de l'activité d'édition et non à une toxicité et/ou une inhibition d'un processus
15 cellulaire impliqué dans la synthèse ou la sécrétion de la protéine chimérique et notamment les processus généraux de transcription et/ou de traduction de la cellule. Des exemples d'acides nucléiques contrôles sont décrits en détail dans la partie expérimentale qui suit.

Dans un mode de réalisation particulier, la protéine chimérique comprend
20 une protéine fluorescente comme polypeptide rapporteur et la mesure de la quantité de protéines chimériques sécrétées dans le milieu est effectuée par mesure de la fluorescence dans le milieu de culture après élimination des cellules. Dans un autre mode de réalisation, la protéine chimérique comprend un polypeptide rapporteur ayant une activité β -lactamase et la
25 mesure de la quantité de protéines chimériques sécrétées dans le milieu est effectuée par spectrophotométrie. Dans un autre mode de réalisation, la protéine chimérique comprend un polypeptide rapporteur ayant une activité chimiluminescente et la mesure de la quantité de protéines chimériques sécrétées dans le milieu est effectuée à l'aide d'un luminomètre.

L'invention porte en outre sur toute utilisation d'un acide nucléique éditable ou d'un vecteur d'expression tel que défini ci-dessus pour la mise en œuvre d'une méthode de criblage d'inhibiteurs de l'activité d'une enzyme d'édition telle que Apobec-1 ou l'un de ses analogues.

5 L'invention vise également un kit pour la mise en œuvre d'une telle méthode, comprenant soit un acide nucléique éditable selon l'invention, soit un vecteur d'expression selon l'invention, soit une cellule comprenant un acide nucléique selon l'invention et le cas échéant, des tampons appropriés pour la mise en œuvre de la méthode de criblage et/ou des instructions
10 pour la mise en œuvre de la méthode de criblage. Le kit peut comprendre en outre les acides nucléiques « contrôles » ou les vecteurs ou les cellules comprenant ces acides nucléiques « contrôles » tels que décrits précédemment.

Dans un mode de réalisation particulier, les molécules testées dans le
15 cadre de la méthode de criblage selon l'invention sont par exemple choisies parmi des analogues des inhibiteurs de la cytidine déaminase comme la zébularine, la 5-fluorozébularine, la 3,4,5,6-tétrahydrouridine et la 3-déazacytidine. De préférence, des molécules candidates pour la mise en œuvre du procédé de criblage sont des molécules telles qu'identifiées en
20 fonction de leur structure tridimensionnelle prédite et de la structure tridimensionnelle prédite de Apobec-1.

Les caractéristiques de l'invention mentionnées ci-dessus, ainsi que d'autres, apparaîtront plus clairement à la lumière des exemples présentés ci-après.

DESCRIPTION DES FIGURES

Fig 1. **Un système rapporteur pour l'édition de l'apoB.**

Fig 2. **pAE.C, le système rapporteur «éritable».**

Fig 3. **pAE.U, le système rapporteur «édité».**

5 Fig 4. **pAE.G, le système rapporteur «non-éritable».**

Fig 5. **Constructions des rapporteurs : A.** La première étape consiste à insérer les gènes rapporteurs entre les sites BglII et SacII du plasmide pDisplay. La seconde à insérer le fragment de l'apoB entre les sites SacII et Sall. **B.** Le site de clonage est montré ainsi que les étiquettes HA et Myc.

10 Fig 6. **Caractérisation des clones cellulaires McArdle-Apobec exprimant le rapporteur β -lactamase : A.** Les protéines extraites des milieux de culture et des lysats cellulaires sont séparées par la technique de SDS-PAGE et détectées au moyen d'un anticorps anti-HA. Les deux isoformes du rapporteur β -lactamase diffèrent d'environ 14,5 kDa. Elles
15 sont marquées par une flèche pleine pour la forme éditée et vide pour la forme éditée. **B.** L'organisation des deux isoformes est schématisée. Il faut noter la présence de l'étiquette HA placée entre le peptide signal et la rapporteur.

20 Fig 7 : **Activité β -lactamase du milieu extracellulaire des clones cellulaires McArdle-Apobec exprimant le rapporteur β -lactamase.** Les différents clones cellulaires testés sontensemencés en plaques 96 puits. Le lendemain, le milieu extracellulaire est changé pour un milieu DMEM dépourvu de rouge phénol et contenant 1% de sérum de veau foetal. Le surlendemain, 50 μ l de ce milieu extracellulaire sont incubés avec 50 μ l de

CCF2 (0,4 μ M CCF2 dans 50 mM sodium phosphate, pH 7.0) pendant 1 heure à température ambiante. La fluorescence du produit de la réaction est détectée à 460 nm sur un lecteur Envision avec une longueur d'onde d'excitation à 405 nm. Chacune des barres représente une mesure faite à partir de puits de cellules indépendants.

Fig. 8 : **Séquence codante du gène ApoB et du polypeptide correspondant.**

PARTIE EXPERIMENTALE

Mise en œuvre d'un test cellulaire pour le criblage d'inhibiteurs de l'activité de Apobec-1.

Pour la construction d'un vecteur d'expression approprié pour la mise en œuvre du procédé de criblage selon l'invention, le plasmide pDisplay (Invitrogen, Chesnut *et al.*, 1996, Li, 2000) a été utilisé. Celui-ci comprend :

- **un peptide signal** pour l'adressage extracellulaire.
- **une étiquette HA** (Hemagglutinine de l'Influenza)
- **un site de clonage**
- **une étiquette myc** afin de détecter la partie C-terminale, et,
- **une séquence codant pour la partie transmembranaire du récepteur au PDGF** pour l'ancrage à la membrane plasmique.

Les phases codantes de trois rapporteurs (EGFP, β -lactamase et luciférase) ainsi que la zone d'édition d'ApoB (positions 6507-6860 de la séquence du gène apoB) ont été amplifiées. Différentes versions de cette dernière ont été obtenues :

- une version comprenant un codon éditable CAA constituant la version éditable,
- une version identique à la première mais comprenant un codon stop TAA à la place du codon CAA (contrôle positif équivalent à 100% d'édition pour évaluer la spécificité de la modulation observée vis-à-vis de l'activité d'édition).
- Une version identique aux versions précédentes mais comprenant un codon GAA non éditable à la place du codon CAA (contrôle négatif équivalent à 0% d'édition).

Les séquences codant les polypeptides rapporteurs ont d'abord été introduites dans le vecteur pDisplay, puis les différentes versions de la zone d'édition d'ApoB ont été ajoutées afin de constituer les plasmides suivants:

- pAE.C (pour la cytidine au niveau du site d'édition)
- pAE.U (pour la thymidine au niveau du site d'édition)
- pAE.G (pour la guanine au niveau du site d'édition)

Le plasmide pAE.C a été transfecté dans des cellules HepG2 surexprimant Apobec-1. Il permet la synthèse d'un ARN messager éditable (figure 2) :

- S'il n'y a pas d'édition : la séquence n'est pas modifiée, l'ARN est entièrement traduit, et la protéine synthétisée contient le domaine transmembranaire du récepteur au PDGF qui permet son ancrage à la membrane. La protéine chimérique traduite de l'ARN messager non édité n'est pas sécrétée dans le milieu extracellulaire.
- S'il y a édition : la cytidine du site d'édition est modifiée par Apobec-1 et le codon CAA est changé en un codon stop UAA. La protéine traduite de l'ARN messager édité est plus courte et dépourvue de domaine transmembranaire. Elle est par conséquent sécrétée dans le milieu extracellulaire.

- Les inhibiteurs d'Apobec-1 devraient entraîner une diminution du nombre de molécules d'ARNs messagers édités, le rapporteur restant ancré à la membrane.

En outre, si l'inhibiteur est spécifique d'Apobec-1, il ne devrait pas affecter le niveau de protéines produites sous le contrôle des plasmide pAE.U (contrôle positif, figure 3) et pAE.G (contrôle négatif, figure 4).

A. MATERIEL ET METHODES

Construction des vecteurs d'expression

La phase codante de différents rapporteurs à été amplifiée par la polymérase d'ADN Pfu (Stratagene) selon les conditions décrites par le fabricant grâce aux paires d'oligonucléotides suivantes :

- l'EGFP par
 - EGFPBglF (GAGATCTGTGAGCAAGGGCGAGGAGC) et
 - EGFPSacR (GCCGCGGCTTGTACAGCTCGTCCATGC)à partir du vecteur pEGFP-C2 (Clontech) ;
- la luciférase de luciole par
 - LucBglF (GAGATCTGTCACCGACGCCAAAACATA) et
 - LucSacR (GCCGCGGCACGGCGATCTTTCCGCCC)à partir du vecteur pSP-luc+NF (Stratagene)
- la β -lactamase par
 - LactBglF (GAGATCTCACCCAGAAACGCTGGTGAA) et
 - LactSacR (GCCGCGGCCAATGCTTAATCAGTGAG)à partir du vecteur pEF1V5HisA (Invitrogen).

Les fragments amplifiés ont été purifiés sur gel d'agarose, extraits et purifiés au moyen du Gel Extraction kit (Qiagen). Puis, ils ont été sousclonés dans le vecteur pCR-Blunt (Invitrogen) selon les conditions

décrites par le fabricant. L'intégrité de la séquence a été vérifiée par séquençage. Les fragments codant pour ces rapporteurs ont été excisés par les enzymes BglII et SacII et ont été insérés dans ces mêmes sites dans le vecteur pDisplay (InVitrogen) (Fig. 5). Les vecteurs obtenus sont respectivement pDisplay-EGFP, pDisplay-Luc et pDisplay-Lac.

Les ARN ont été extraits à partir de cellules HepG2 au moyen du RNeasy Kit (Qiagen). La phase codante autour de la zone d'édition de l'ApoB (6507-6860) a été amplifiée par RT-PCR au moyen du kit OneStep (Qiagen) avec les oligonucléotides ApoBEdF (GCCGCGGAATTCATTCAATTGGGAGAGACAA) et ApoBEdR (GGTCGACACTACTTCCACTTTTGTAAAATC). La base cytidine 6666 de ce fragment a été mutée en thymidine et en guanidine par la méthode PCR en utilisant la polymérase d'ADN Pfu (Stratagene). Les fragments amplifiés ont été sousclonés et vérifiés comme décrit précédemment. Les fragments codant l'apoB(6507-6860), l'apoB(6507-6860)[C6666G] et l'apoB(6507-6860)[C6666T] ont été excisés par SacII et Sall et sousclonés dans les mêmes sites en aval des gènes rapporteurs des vecteurs pDisplay-EGFP, pDisplay-Luc et pDisplay-Lac (Fig. 5). On obtient ainsi :

pAE.C-EGFP pour l'apoB(6507-6860) dans pDisplay-EGFP
 pAE.G-EGFP pour l'apoB(6507-6860)[C6666G] dans pDisplay-EGFP
 pAE.U-EGFP pour l'apoB(6507-6860)[C6666T] dans pDisplay-EGFP
 pAE.C-Luc pour l'apoB(6507-6860) dans pDisplay- Luc
 pAE.G- Luc pour l'apoB(6507-6860)[C6666G] dans pDisplay-Luc
 pAE.U- Luc pour l'apoB(6507-6860)[C6666T] dans pDisplay-Luc
 pAE.C-Lac pour l'apoB(6507-6860) dans pDisplay-Lac
 pAE.G- Lac pour l'apoB(6507-6860)[C6666G] dans pDisplay-Lac
 pAE.U- Lac pour l'apoB(6507-6860)[C6666T] dans pDisplay-Lac

pAE.n signifie plasme Apob Edition et la lettre n associée correspond à la nature de la base (soit C pour cytidine, soit G pour guanidine, soit U pour uridine) en position 6666 du fragment de l'apoB.

Les fragments codant pour chacun des rapporteurs ont été excisés par les enzymes BamHI et XhoI et sousclonés dans les mêmes sites du plasmide pcDNA3.1(+)-Hygro (Invitrogen). On obtient ainsi la série de plasmides pAEH pour plasmide Apob Editant Hygromycine-resistant.

5

Lignées cellulaires

Les lignées MacArdleRH777 et HepG2 ont été obtenues de LGC Promochem et cultivés respectivement dans le milieu de culture DMEM (Sigma) et MEM (Cambrex). Elles ont été transfectées au moyen du Fugene 6 (Roche) par un vecteur d'expression codant l'ApoBec-1 humaine et possédant un gène de résistance à la néomycine. Les clones cellulaires ayant intégrés le vecteur ont été sélectionnés par un traitement à 1 g/l de G418 (Cambrex). Les clones isolés ont été criblés pour leur capacité à éditer la cytidine 6666 du messenger de l'apoB (voir méthode ci-dessous). Les meilleurs clones de chacune de ces lignées, McArdle-ApoBec et HepG2-ApoBec, éditent respectivement à 100% et à 50% le messenger de l'apoB. Ces deux lignées constituent la première étape de la construction de notre système rapporteur. Elles ont ensuite été transfectées par les plasmides pAEH décrit précédemment au moyen du Fugene 6. Les clones cellulaires ayant intégrés ce second vecteur ont été sélectionnés par un traitement à 0,25 g/l d'hygromycine (Ozyme) tout en maintenant une concentration de 0,5 g/l de G418. Les lignées cellulaires étudiées sont ensemencées à une densité de 80 000 cellules/cm² dans du milieu contenant 10% sérum de veau foetal (Invitrogen) mais dépourvu de rouge phénol en présence de G418 et d'hygromycine. Le lendemain, le milieu est changé. C'est à cette étape que les cellules sont traitées par les molécules candidates lors du criblage à haut débit. Le surlendemain, le milieu extracellulaire est prélevé pour analyse.

Caractérisation des lignées cellulaires

RT-PCR/Séquençage

Les ARN des cellules étudiées ont été extraits par RNeasy Kit (Qiagen) et l'ADNc d'intérêt a été amplifié par OneStep kit (Qiagen) en utilisant une
5 paire d'oligonucléotides spécifiques. Certains produits de RT-PCR ont été purifiés par PCR purification kit (Qiagen), séquencés au moyen du kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) et analysés sur ABI3100 (Applied Biosystems).

La région autour du site d'édition de l'apoB endogène a été amplifiée par
10 les oligonucléotides rApoBEdF (GCATCTGACTGGGAGAGACAAG) et rApoBEdR (GGATATGATACTGTTCGTCAAGC), pour les cellules MacArdleRH777 et ses dérivés, et par hApoB6344-F (AAGAAAATACAGAGCAGCCCT) et hApoB6820-R (GTGCTGGATGTCTATATTCTG) pour les cellules HepG2 et ses dérivés.

15 Le fragment de l'apoB des rapporteurs a été amplifié par, d'un côté un oligonucléotide spécifique du début du fragment codant pour le PDGF-R (PDGFR_{tm}-R : AAAGGGCAAGGAGTGTGGC) et de l'autre par un oligonucléotide spécifique de la fin du fragment codant pour le gène rapporteur : EGFP646F (AAGACCCCAACGAGAAGC) pour l'EGFP,
20 Lac812F (GGCAACTATGGATGAACG) pour la β -lactamase et Luc1645F (CCAAGAAGGGCGGAAAGA) pour la luciférase.

La nature de la base en position 6666 est caractérisée par séquençage en utilisant soit rApoB-seq (AAGTAGCTGGTGCCAAGGA) pour l'ApoB endogène de rat soit hApoB6638R (CACGGATATGATAGTGCTCAT) pour
25 l'ApoB endogène humaine et les rapporteurs.

Expression des gènes rapporteurs

Au jour n°2, les cellules sont rincées dans du milieu dépourvu de sérum et cultivées toute la nuit dans ce milieu. Au jour n°3, le milieu de culture est prélevé et dilué de moitié dans du tampon Laemmli 2X concentré. Cette
5 fraction correspond au milieu extracellulaire. Les cellules sont lavées au PBS et les cellules sont lysées dans le tampon Laemmli 1X. Les extraits sont ensuite analysés par séparation par SDS-PAGE. La présence des rapporteurs est révélée par immunoblot au moyen d'un anticorps dirigé contre l'épitope HA qui est situé entre le peptide signal et le gène
10 rapporteur.

Activité des rapporteurs

Fluorescence du rapporteur EGFP

Au jour n°2, le milieu de culture est changé pour du milieu Ham's/F12 dépourvu de rouge phénol. Ce milieu de culture est le milieu commercial
15 donnant la fluorescence la plus basse. Au jour n°3, la fluorescence du milieu extracellulaire est directement mesurée sur un détecteur Analyst HT (Molecular Device) (excitation à 485 nm, émission à 510 nm, miroir dichroïque à 505 nm et polarisation sur le plan p des longueurs d'onde d'excitation et d'émission).

20 Activité β -Lactamase

Au jour n°2, le milieu de culture est changé pour du milieu contenant 1% sérum de veau foetal. Au jour n°3, l'activité β -lactamase est détectée par différents substrats : le CENTA (Calbiochem); la Nitrocefin (Calbiochem) et le CCF2 (InVitrogen). Ce dernier étant le plus économique et donnant le
25 rapport signal/bruit le plus faible, il a été choisi pour la suite des expériences. 50 μ l de milieu extracellulaire ont été mélangés avec 50 μ l de substrat (0,4 μ M CCF2 dans 50 mM sodium phosphate, pH 7.0). La réaction est suivie par la mesure de la fluorescence sur un détecteur

Envision (Perkin Elmer). L'excitation est fixée à 405 nm, l'apparition du produit est mesurée à 460 nm alors que la disparition l'est à 530 nm.

B. RESULTATS

Les systèmes rapporteurs ont été construits en deux étapes. Dans un premier temps, les phases de lecture des trois rapporteurs choisis ont été sousclonées dans le vecteur pDisplay (Fig. 5, étape 1) pour donner les trois plasmides pDisplay-EGFP, pDisplay-Luc et pDisplay-Lac. Dans un second temps, les fragments 6507-6860 de l'apoB humaine, ou de ses deux mutants [C6666G] et [C6666T], ont été sousclonés en aval de ces trois systèmes rapporteurs (Fig. 5, étape 2) pour donner les vecteur pAE.n (pour plasme Apob Eding, la lettre n (C, G ou U) correspondant à la nature de la base cible de l'édition). Enfin, la dernière étape de ces constructions a consisté à transférer les phases codantes de ces rapporteurs dans un vecteur d'expression portant un gène de sélection différent de celui utilisé pour établir l'expression stable de l'Apobec-1, c'est-à-dire le gène de résistance à la néomycine. Nous avons choisi le plasmide pcDNA3.1(+)-Hygro comme second système d'expression car ce plasmide permet une sélection à l'hygromycine B. Les neuf plasmides obtenus ont été nommés pAEH.n (pour plasme Apob Eding Hygromycine-resistant, la lettre n (C, G ou U) correspondant à la nature de la base cible de l'édition).

Ces vecteurs ont été transfectés dans les cellules McArdle-Apobec et HepG2-Apobec et soumis à une pression de sélection à l'hygromycine. L'expression des systèmes rapporteurs a été caractérisée par RT-PCR en utilisant des oligonucléotides spécifiques des régions encadrant le fragment de l'apoB dans les rapporteurs. Seuls ont été conservés les clones exprimant un taux élevé de rapporteur. La zone d'édition de l'apoB endogène a été amplifiée au moyen d'oligonucléotides spécifiques et la nature du résidu en position 6666 a été vérifiée par séquençage.

Les clones positifs sont ensuite testés par immunoblot pour l'expression et la sécrétion du gène rapporteur. La figure 6 montre le résultat obtenu avec le système β -lactamase dans les McArdle-Apobec. L'anticorps anti-HA peut révéler deux protéines ayant une différence correspondant à la fin du fragment de l'apoB et au domaine transmembranaire du récepteur au PDGF, c'est-à-dire environ 14,5 kDa (voir Fig 6B). Trois groupes de clones cellulaires ont été testés : un premier groupe (pistes 1 et 2) correspond au rapporteur « non-éditable », c'est-à-dire portant la mutation [C6666G] dans le fragment d'ApoB, un second groupe (pistes 3 à 6) correspond au rapporteur « éditable », c'est-à-dire portant la séquence endogène de l'ApoB et enfin le dernier groupe (piste 7) correspond au rapporteur « édité », c'est-à-dire portant la mutation [C6666T] dans le fragment d'ApoB.

Dans les lysats cellulaires des clones exprimant le rapporteur « non-éditable », on peut détecter la forme longue du rapporteur (piste 1 et 2, panneau du haut). Cette forme longue n'est pas détectée dans le milieu extracellulaire (piste 1 et 2, panneau du bas). Dans les lysats cellulaires des clones exprimant le rapporteur « éditable », la forme courte tronquée du rapporteur est principalement détectée, ce qui signifie que l'édition du rapporteur par l'Apobec-1 a bien abouti à la synthèse d'une forme courte du rapporteur (pistes 3 à 6, panneau du haut). Une forme longue du rapporteur est également détectée pour le clone C.7 (piste 4), ce qui signifie que, dans ce cas-ci, l'édition n'est que partielle. Dans tous les cas, la forme courte de ce rapporteur est retrouvée dans le milieu extracellulaire (pistes 3 à 6, panneau du bas). Enfin, dans les lysats cellulaires des clones exprimant le rapporteur « édité », seule la forme courte du rapporteur est observée, que ce soit dans le lysat cellulaire ou dans le milieu extracellulaire (piste 7). Les mêmes résultats ont été observés avec les deux autres systèmes rapporteurs EGFP et luciférase. Le même type de résultat est obtenu lorsque ces trois types de rapporteurs sont exprimés dans les cellules HepG2-Apobec. Cependant, une différence dans le rapport forme courte versus forme longue dans le cas du rapporteur éditable est observé, ce qui

est en concordance avec le fait que le clone HepG2-Apobec parental n'édite l'apoB qu'à environ 50%.

L'activité des rapporteurs a ensuite été mesurée dans le milieu extracellulaire. Nous avons pu y détecter la présence d'EGFP et l'activité β -lactamase mais pas l'activité luciférase. Ce résultat est surprenant car la luciférase est extrêmement sensible. Cependant, il est possible que l'activité de certains rapporteurs soit affectée par leur transfert dans la voie de sécrétion.

L'activité β -lactamase des meilleurs clones cellulaires caractérisés dans la figure n°6 est montrée dans la figure n°7. Les milieux extracellulaires des clones exprimant le rapporteur « éditable » (C.7 et C.8), ainsi que celui du clone exprimant le rapporteur « édité » (U.5), contiennent une forte activité β -lactamase. En revanche, le milieu extracellulaire du clone exprimant le rapporteur « non-éritable » (G.17), qui ne sécrète pas de rapporteur, ne contient pas d'activité β -lactamase. Les trois barres montrées correspondent à des mesures réalisées sur trois puits ensemencés indépendamment par la même suspension de cellules. La mesure d'activité β -lactamase est très reproductible d'un puits à l'autre, ce qui en fait un système particulièrement adapté pour le criblage à haut débit. Nous avons obtenu le même type de résultat avec le système rapporteur EGFP. Cependant, la fluorescence basale élevée des milieux de culture affecte la sensibilité de ce système. Enfin, nous avons également obtenu des résultats comparables pour ces trois systèmes lorsqu'ils ont été exprimés dans les cellules HepG2-Apobec.

REVENDEICATIONS

1. Acide nucléique approprié pour le criblage de molécules inhibitrices de l'activité d'une enzyme d'édition, notamment de l'enzyme Apobec-1 ou d'un analogue de Apobec-1, comprenant une phase ouverte de lecture comprenant au moins les éléments suivants dans le sens 5'-3' :
 - a. une séquence codant un peptide signal permettant l'adressage extracellulaire d'un polypeptide auquel ledit peptide signal est fusionné,
 - b. une séquence codant un polypeptide rapporteur, en phase avec la séquence du peptide signal,
 - c. un site d'édition comprenant un codon éditable en phase avec la séquence codante du polypeptide rapporteur défini en b., ledit site d'édition étant choisi parmi les séquences susceptibles d'être éditées par une enzyme d'édition, soit par substitution d'un nucléotide situé au niveau d'un codon par un autre nucléotide pour former un codon stop, soit par insertion ou suppression d'un nucléotide dans la phase codante conduisant à un décalage de phase, soit par substitution d'un nucléotide situé au niveau d'un codon stop par un autre nucléotide pour former un codon codant,
 - d. une séquence codant pour une région transmembranaire d'ancrage à la membrane plasmique.
2. Acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce que le codon éditable du site d'édition est le codon CAA susceptible d'être édité en codon stop UAA, par une enzyme Apobec-1 ou l'un de ses analogues.
3. Acide nucléique selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le site d'édition est une région de la phase codante du gène apoB,

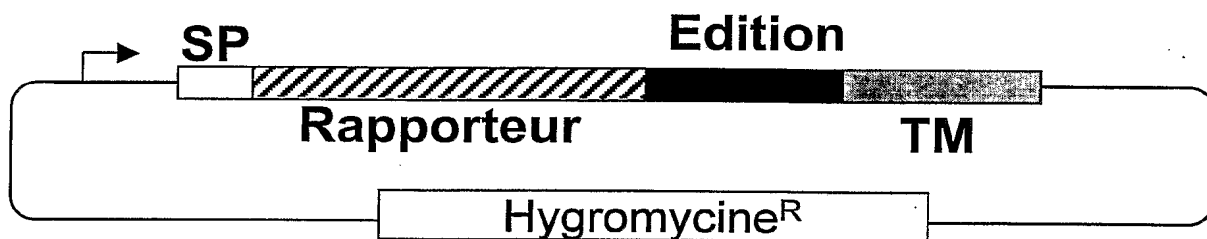
- éditable par l'enzyme Apobec-1, de préférence une région comprenant les nucléotides 6666 à 6681 de la séquence de apoB définie à la figure 8, et de manière encore plus préférée une région comprenant les nucléotides 6645 à 6703, ou encore une région ayant au moins 60% d'identité avec la région d'édition de la phase codante de apoB constituée des nucléotides 6648 à 6681, de préférence 70% d'identité avec cette dernière, voire 80% d'identité, et conservant la propriété d'être éditable par l'enzyme Apobec-1.
- 5
4. Acide nucléique selon la revendication 3, caractérisé en ce que le site d'édition comprend la région codante de apoB constituée des nucléotides 6507 à 6860 de la séquence de apoB définie à la figure 8.
- 10
5. Acide nucléique selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence codant le polypeptide rapporteur est choisie dans le groupe constitué des rapporteurs EGFP, β -lactamase et luciférase.
- 15
6. Acide nucléique selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence codant le peptide signal est choisie dans le groupe constitué de peptide suivants : le peptide SS, l'hormone de croissance, l'activateur du plasminogène tissulaire, l'interleukine-2, la chaîne κ des immunoglobulines, l'alkaline phosphatase, l'haemaglutinine d'Influenza.
- 20
7. Acide nucléique selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence codant la région transmembranaire est choisie dans le groupe constitué du domaine transmembranaire du récepteur humain de la transferrine, du domaine transmembranaire de la chaîne B du récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes humain (PDGFR), du domaine transmembranaire B7-1 de souris (B7) et du domaine
- 25

transmembranaire de type II de la sous-unité H1 du récepteur de l'asialoglycoprotéine (ASGPR).

8. Vecteur comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 7, et les séquences permettant l'expression de la phase ouverte de lecture telle que définie à la revendication 1, dans une cellule hôte appropriée.
9. Cellule hôte caractérisée en ce qu'elle comprend l'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 7 ou un vecteur selon la revendication 8.
10. Cellule hôte selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 7, ou un vecteur selon la revendication 8, et en ce qu'elle comprend une séquence permettant la synthèse d'une enzyme d'édition fonctionnelle, notamment Apobec-1 ou l'un de ses analogues, susceptibles d'éditer l'acide nucléique tel que défini à l'une des revendications 1 à 7.
11. Cellule hôte selon la revendication 10, caractérisée en ce que la séquence permettant la synthèse de l'enzyme d'édition est intégrée de manière stable dans son génome.
12. Méthode de criblage d'inhibiteurs de l'activité d'une enzyme d'édition, ladite méthode comprenant :
 - a. la culture d'une cellule selon l'une des revendications 9 à 11, dans des conditions appropriées pour la synthèse d'une enzyme d'édition et d'une protéine chimérique comprenant au moins le peptide signal, le polypeptide rapporteur et la région transmembranaire tels que définis à l'une des revendications 1 à 7, en présence ou en absence d'un composé candidat,

- b. la mesure de la quantité de protéines chimériques sécrétées dans le milieu de culture, en présence ou en absence du composé candidat,
- 5 c. la mesure de la quantité de protéines chimériques ancrées à la membrane cellulaire par la région transmembranaire,
- d. la mise en évidence, en présence du composé candidat, d'une variation de la quantité relative de protéines chimériques sécrétées et/ou ancrées à la membrane cellulaire par rapport à la quantité relative de protéines chimériques sécrétées et/ou ancrées à la membrane cellulaire en absence du composé candidat indiquant que ledit composé candidat est un inhibiteur de l'activité d'édition de l'enzyme d'édition.
- 10
13. Méthode selon la revendication 12, caractérisée en ce que l'enzyme d'édition choisie est l'enzyme Apobec-1 ou l'un de ses analogues.
- 15 14. Méthode selon la revendication 12 ou 13, caractérisée en ce que la protéine chimérique comprend une protéine fluorescente comme polypeptide rapporteur et en ce que la mesure de protéines chimériques sécrétées dans le milieu est effectuée par mesure de la fluorescence dans le milieu de culture après élimination des cellules.
- 20 15. Utilisation d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 7 ou d'un vecteur selon la revendication 8, pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une des revendications 12 à 14.
- 25 16. Kit pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une des revendications 12 à 14, comprenant soit un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 7, soit un vecteur selon la revendication 8, soit une cellule selon l'une des revendications 9 à 11, et le cas échéant, des tampons appropriés et/ou des instructions pour la mise en œuvre d'une méthode de criblage selon l'une des revendications 12 à 14.

1 / 14



SP: Peptide signal

Rapporteur: Gène rapporteur (ex: β -Lactamase, GFP...)

Edition: Région d'édition de l'apolipoprotéine B (6507-6860)

TM: Domaine transmembranaire

Fig 1

2 / 14

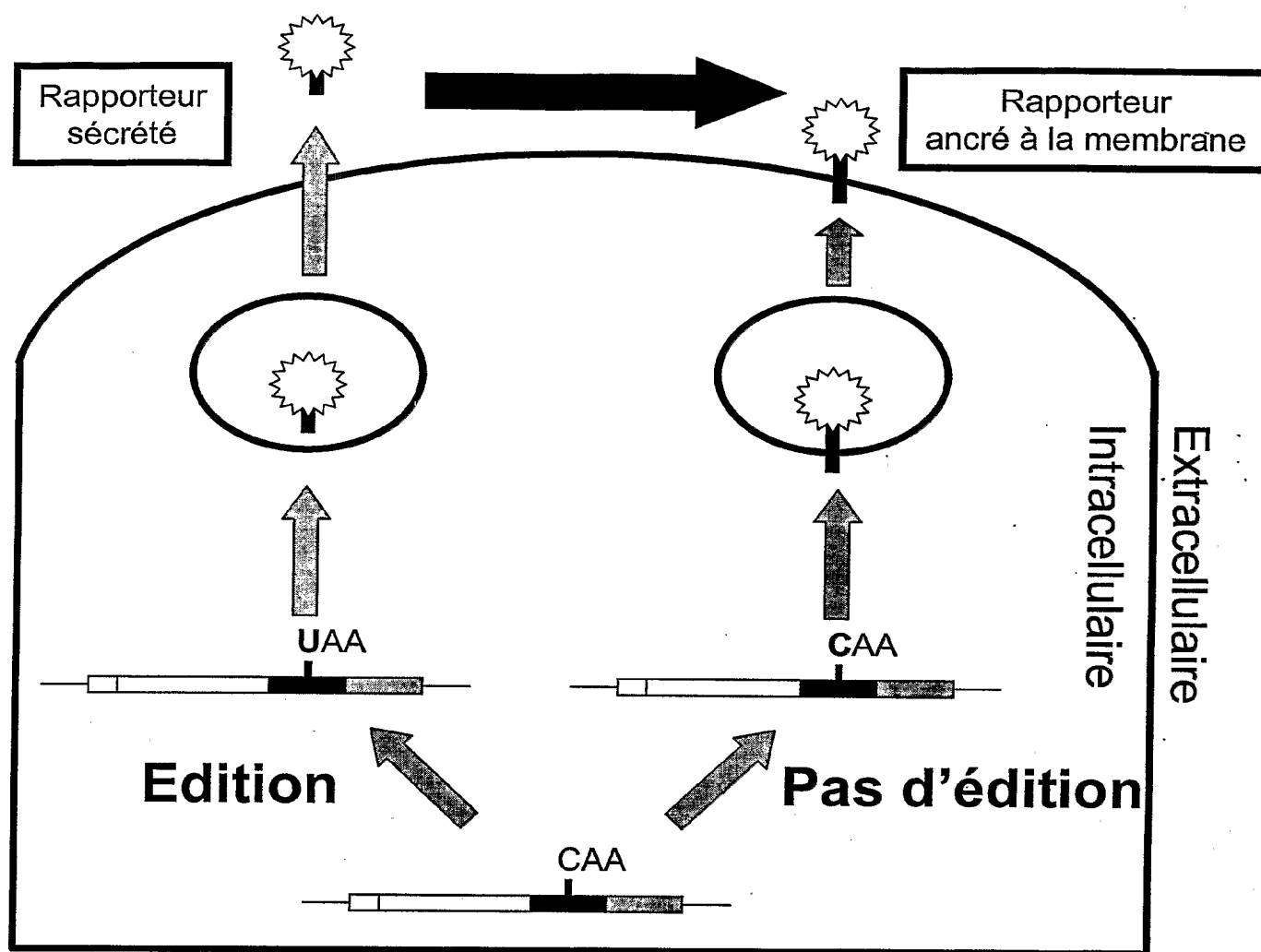


Fig. 2

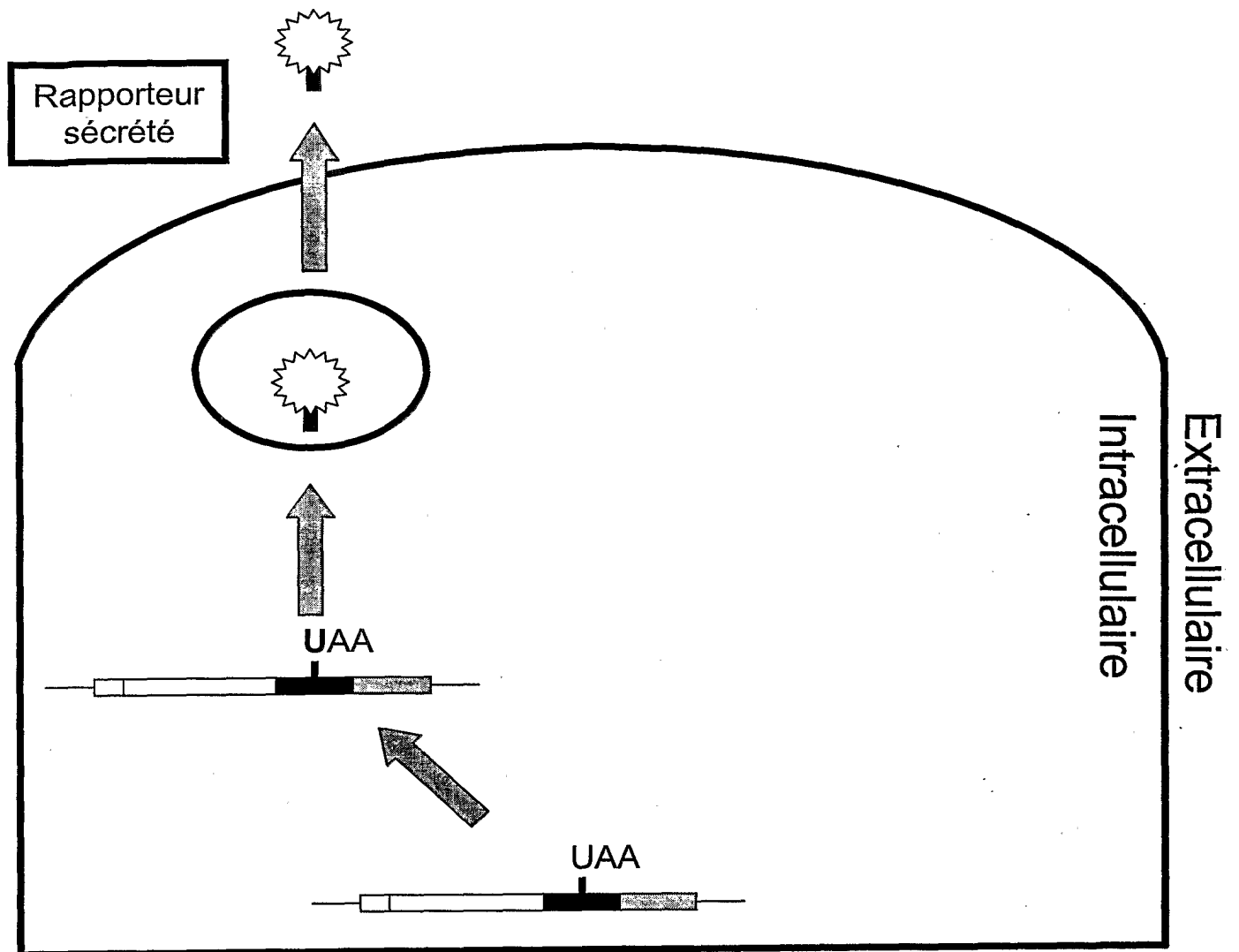


Fig. 3

4 / 14

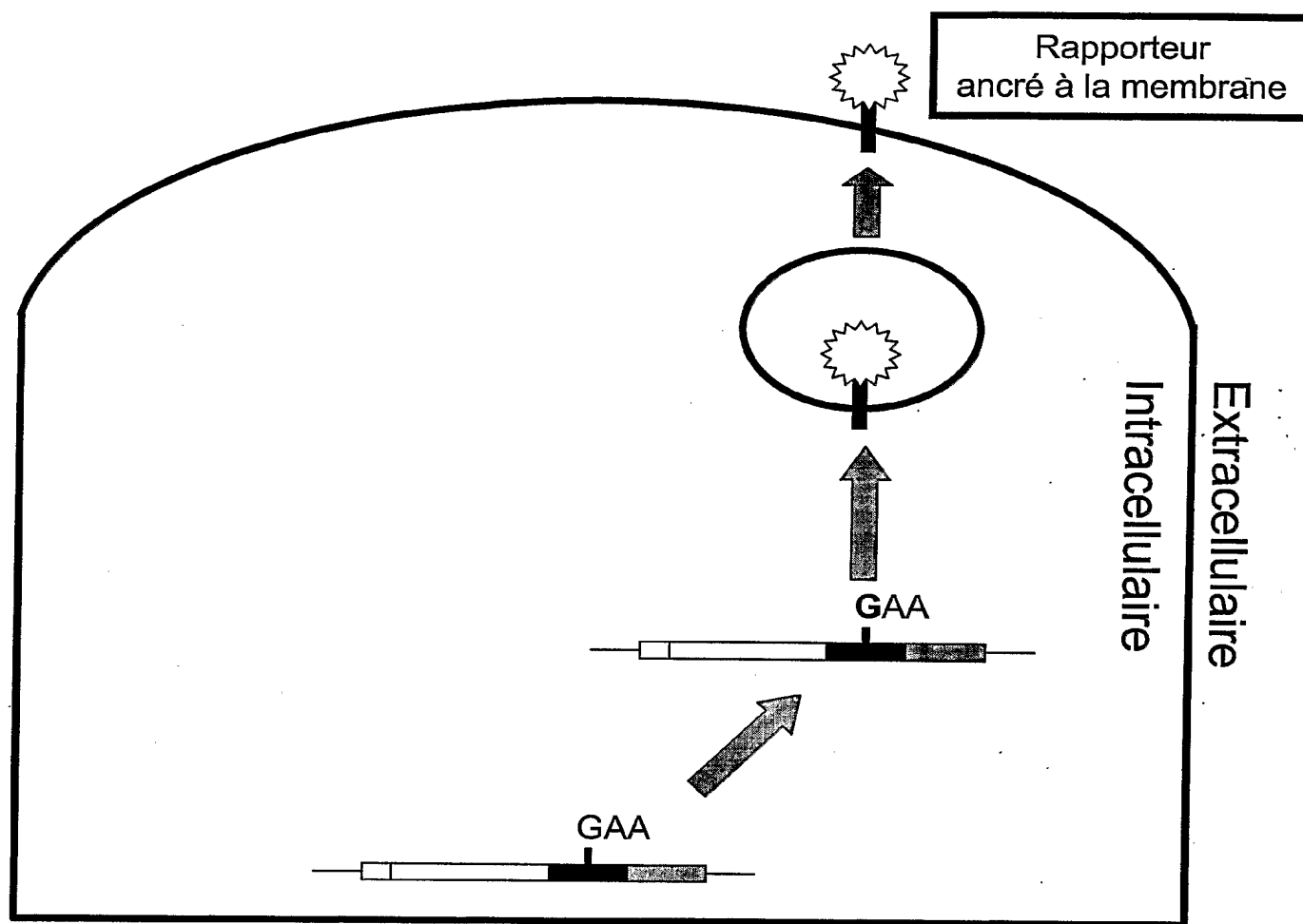
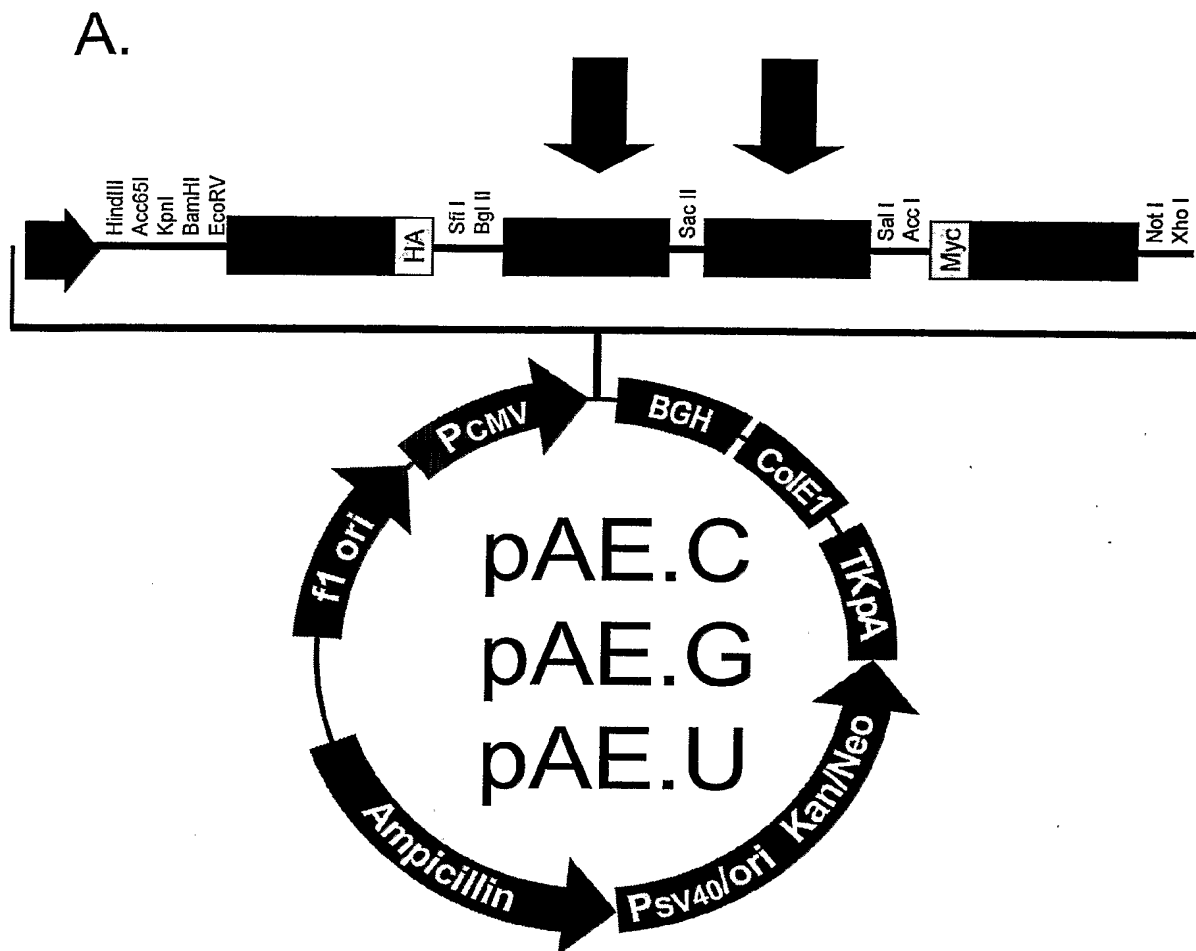


Fig. 4

5 / 14



B.

Peptide signal	HA	BglII
ATG GAG ... GGT GAC TAT CCA TAT GAT GTT CCA GAT TAT GCT GGG GCC CAG CCG GCC AGA TCT ... Rapporteur ...		
M E ... G D Y P Y D V P D Y A G A Q P A R S		
SacII	ApoB(6507-6860)	SalI
... CCG CCG AAT TCA ... AGT AGT GTC GAC GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GCT GTG GGC CAG ...	Myc	PDGFR-TM
... P R N S ... S S V D E Q K L I S E E D L N A V G Q ...		

Fig. 5

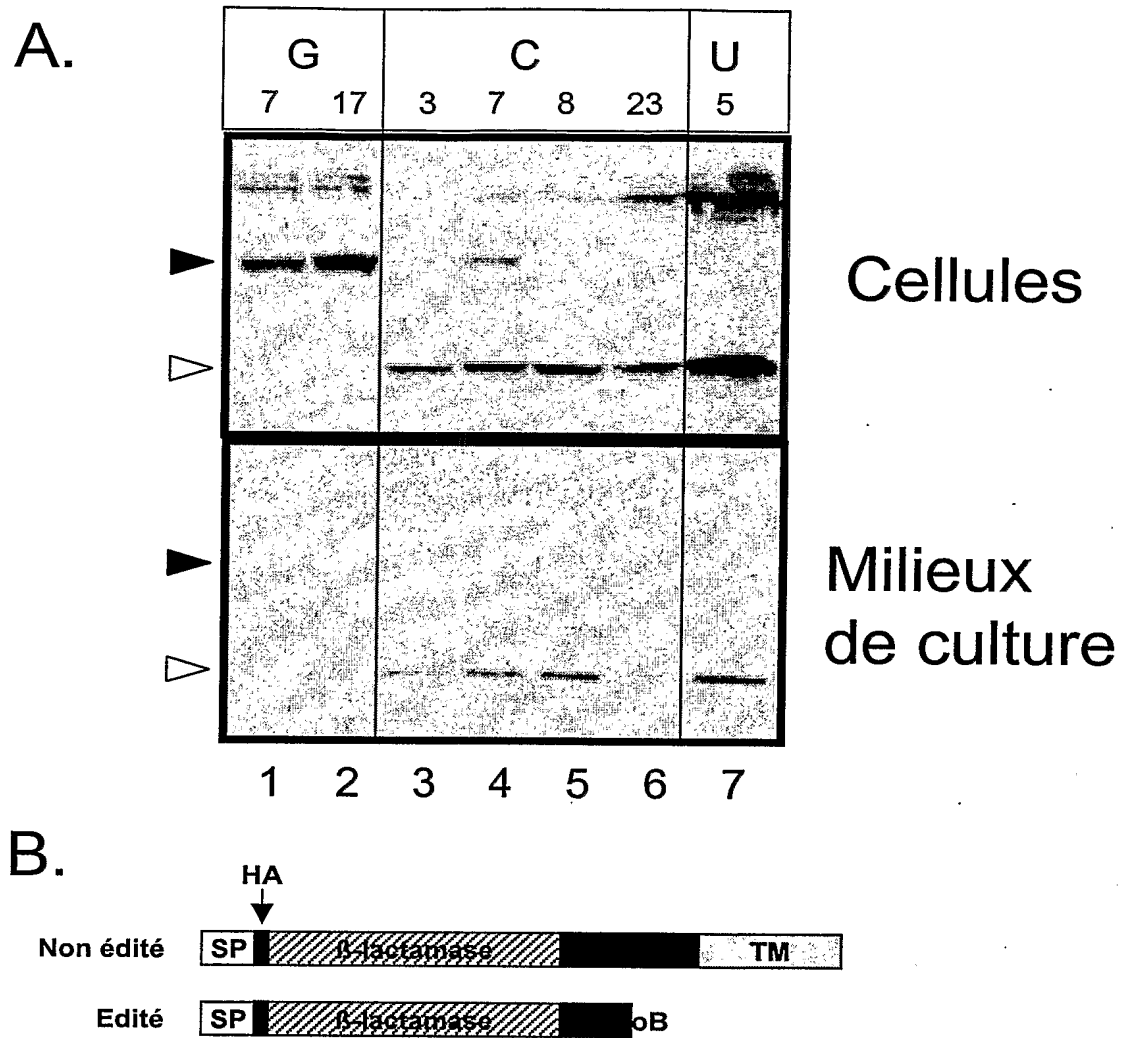


Fig. 6

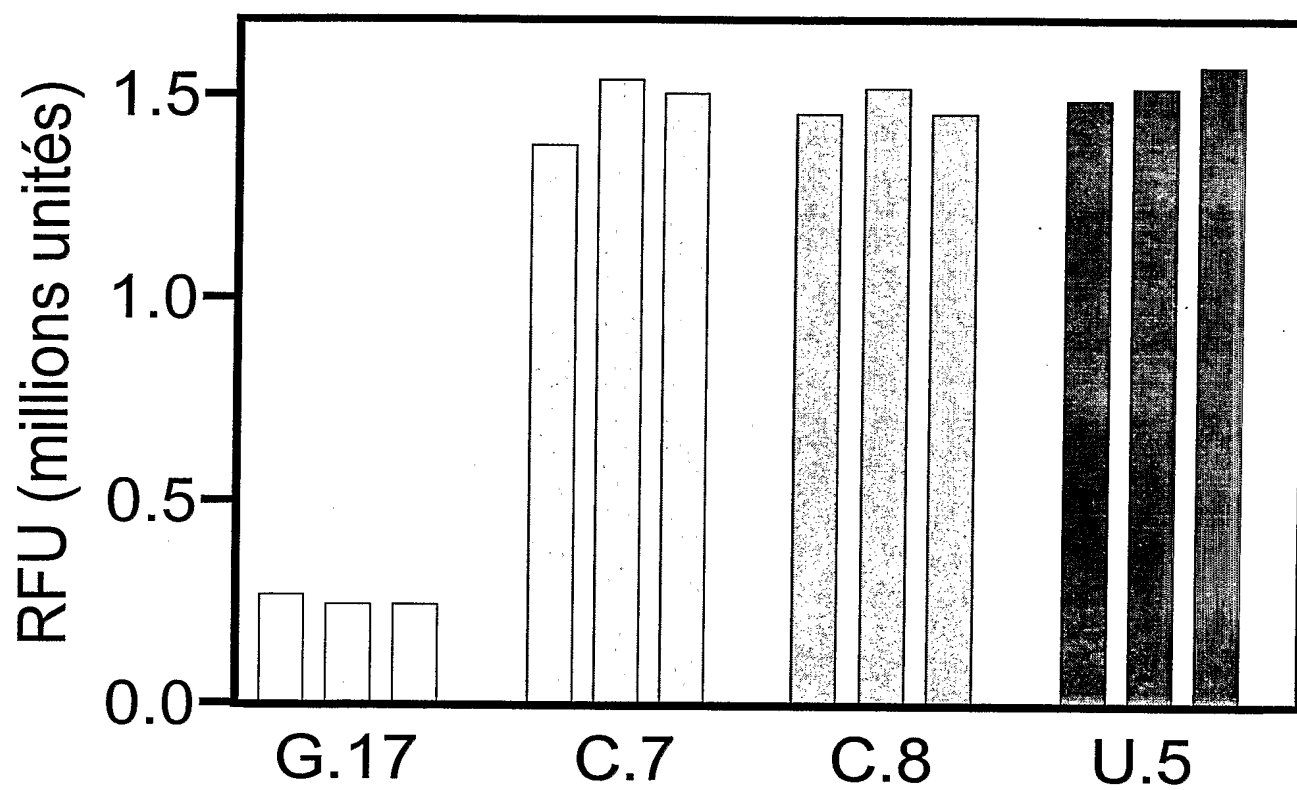


Fig. 7

aaa tct gtt tct ctt cca tca tca ggc cca ggc cca ggc aat ctt ata ttt gat cca aat aac tac ctt cct aaa gaa agc atg ctg aaa act acc ctc act gcc ttt
 K S V S L P S L D P A S A K I E G N L I F D P N N Y L P K E S M L K T T L T A F
 2169/681
 gga ttt gct tca gct gac ctc atc gag att ggc ttg gaa gga aaa ggc ttt gag cca aca ttg gaa gct ctt ttt ggg aag caa gga ttt ttc cca gac agt gtc aac aaa gct ttg tac
 G F A S A D L I E I G L E G K G F E P T L E A L F G K Q G F F P D S V N K A L Y
 2289/721
 tgg gtt aat ggt caa gtt cct gat ggt gtc tct aag gtc tta gtc gac cac ttt ggc tat acc aaa gat gat aat aac cat gag cag gat atg gta aat gga ata atg ctc agt gtt gag aag
 W V N G Q V P D G V S K V L V D H F G Y T K D D K H E Q D M V N G I M L S V E K
 2409/761
 ctg att aaa gat ttg aaa tcc aaa gaa gtc cgc gaa ggc aga ggc tca ctc cgc atc ttg gga gag gag att ggt ttt ggc agt ctc cat gac ctc cag ctc ctg gga aag ctg ctt ctg
 L I K D L K S K E V P E A R A Y L R I L G E E L G F A S L H D L Q L L G K L L L
 2529/801
 atg ggt gcc cgc act ctg cag ggg atc ccc cag atg att gga gag gtc atc agg aag ggc tca aag aat gac ttt ctt ctc tac atc ttc atg gag aat gcc ttt gaa ctc ccc act
 M G A R T L Q G I P Q M I G E V I R K G S K N D F F L H Y I F M E N A F E L P T
 2649/841
 gga gct gga tta cag ttg caa ata tct tca tct gga gtc att gct ccc gga ggc aag gct gga gta aca ctg gaa gta gac aac atg cag gct gaa gta gac ctg gca aaa ccc tcc gtc tct
 G A G L Q L Q I S S G G V I A P G A K A G V K L E V A N M Q A E L V A K P S V S
 2769/881
 gtg gag ttt gtc aca aat atg ggc atc atc att cgc gac ttc gct agg agt ggg gtc cag atg aac acc aac ttc ctc cag gag ctg ggt ctg gag gct cat gtt gcc cta aaa gct ggg
 V E F V T N M G I I P D F A R S G V Q M N T N F F H E S G L E A H V A L K A G
 2889/921
 aag ctg aag ttt atc att cct tcc cca aag aga cca gtc aag ctg ctc agt gga ggc aac aca tta cat ttg gtc tct acc acc aaa acg gag gtc atc cca cct ctc att gag aac agg
 K L K F I I P S P K R P V K L L S G G N T L H L V S T T K T E V I P P L I E N R
 3009/961
 cag tcc tgg tca gtt tgc aag caa gtc ttt cct ggc ctg aat tac tgc acc tca ggc gct tcc aac gcc agc tcc aca gac tcc gcc tcc tac tat ccg ctg acc ggg gac acc aga
 Q S W S V C K Q V F P G G L N Y C T S G A Y S N A S S T D S A S Y Y P L T G D T R
 3129/1001
 tta gag ctg gaa ctg agc cct aca gga gag att gag cag tat tct gtc agc gca acc tat gag ctc cag aga gag gac aga ggc ttg gtc gat acc ctc aag ttt gta act caa gca gaa
 L E L E L R P T G E I E Q Y S V S A T Y E L Q R E D R A L V D T T L K F V T Q A E
 3249/1041
 ggt gcg aag cag act gag gct acc atg aca ttc aaa tat aat cgg cag agt atg acc ttg tcc agt gaa gtc caa att ccg gat ttt gat gtt gac ctc gga aca atc ctc aga gtt aat
 G A K Q T E A T M T F K Y N R Q S M T L S S E V Q I P D F D V D L G T I L R V N
 3369/1081
 gat gaa tct act gag ggc aaa acg tct tac aga ctc acc ctg gac att cag aac aag aaa att act gag gtc gcc ctc atg ggc cac cta agt tgt gag cca aag gaa gaa aga aaa atc
 D E S T E G K T S Y R L T L T L D I Q N K K I T E V A L M G H L S C D T K E E R K I
 3489/1121
 aag ggt gtt att tcc ata ccc cgt ttg caa gca gaa ggc aga agt gag atc ctc gcc cac tgg tgc gct gcc aaa ctg ctt ctc caa atg gac tca tct gct aca gct tat ggc tcc aca
 K G V I S I P R L Q A E A R S E I L A H W S P A K L L L Q M D S A T A Y G S T
 3609/1161
 gtt tcc aag agg gtc gca tgg cat tat gat gaa gag agt att gaa ttt gaa tgg aac aca ggc acc aat gta gat acc aaa atg act tcc aat ttc cct gtc gat ctc tcc gat tat
 V S K R V A W H Y D E E K I E F E W N T G T N V D T K K M T S N F P V D L S D Y
 3729/1201
 cct aag agc ttg cat atg tat gct aat aga ctc ctg gat cac aga gtc cct gaa aca gat atg act ttc cgg cac gtc ggt tcc aaa tta ata gtt gaa atg agc tca tgg ctt cag aag
 P K S L H M Y A N R L L D H R V P E T D M T F R H V G S K L I V A M S S W L Q K
 3849/1241
 gca tct ggg agt ctt cct tat acc cag act ttg caa gac cac ctc atc agc ctg aag gag ttc aac ctc cag aac atg gga ttg oca gac ttc cac atc cca gaa aac ctc ttc tta aaa
 A S G S L P Y T Q T L Q D H L N S L K E F N L Q N M G L P D F H I P E N L F L K
 3969/1281
 agc gat ggc cgg gtc aaa tat acc ttg aac aag aac agt ttg aaa att gag att cct ttg cct ttt ggt ggc aaa tcc tcc aga gat cta aag atg tta gag act gtt agg aca cca gcc
 S D G R V K Y T L N K N S L K I E I P L F G G K S R D L K M L E T V R T P A
 4089/1321
 ctc cac ttc aag tct gtc gga ttc cat ctg cca tct cga gag ttc caa gtc ctc act ttt acc att ccc aag ttg tat caa ctg caa gtc ggt ctc ctg gtt cta gac ctc tcc aag
 4149/1341

Fig 8 b

Fig 8c

Fig 8d

tcc	ata	atc	cca	act	ctc	aac	ctt	aat	gat	ttt	caa	gtt	cct	gac	ctt	cac	ata	cca	gaa	ttc	cag	ctt	ccc	cac	atc	tca	cac	aca	att	gaa	gta	cct	act	ttt	ggc	aag	cta	tac	agt	
F	I	I	P	T	L	N	L	N	D	F	Q	V	P	D	L	H	I	P	E	F	Q	L	P	H	I	S	H	T	I	E	V	P	T	F	G	K	L	Y	S	
8439/2761	8439/2771	8439/2781	8439/2791	8439/2801	8439/2811	8439/2821	8439/2831	8439/2841	8439/2851	8439/2861	8439/2871	8439/2881	8439/2891	8439/2901	8439/2911	8439/2921	8439/2931	8439/2941	8439/2951	8439/2961	8439/2971	8439/2981	8439/2991	8439/3001	8439/3011	8439/3021	8439/3031	8439/3041	8439/3051	8439/3061	8439/3071	8439/3081	8439/3091	8439/3101	8439/3111	8439/3121	8439/3131	8439/3141	8439/3151	
att	ctg	aaa	atc	caa	tct	oct	ctt	ttc	aca	tta	gat	gca	aat	gct	gac	ata	ggg	aat	gga	acc	acc	tca	gca	aac	gaa	gca	ggg	atc	gca	gct	tcc	atc	act	gcc	aaa	gga	gag	tcc	aaa	
I	L	K	I	Q	S	P	L	F	T	L	D	A	N	A	D	I	G	N	G	T	T	S	A	N	E	A	G	I	A	S	I	T	A	K	G	E	S	K		
8529/2801	8529/2811	8529/2821	8529/2831	8529/2841	8529/2851	8529/2861	8529/2871	8529/2881	8529/2891	8529/2901	8529/2911	8529/2921	8529/2931	8529/2941	8529/2951	8529/2961	8529/2971	8529/2981	8529/2991	8529/3001	8529/3011	8529/3021	8529/3031	8529/3041	8529/3051	8529/3061	8529/3071	8529/3081	8529/3091	8529/3101	8529/3111	8529/3121	8529/3131	8529/3141	8529/3151	8529/3161	8529/3171	8529/3181	8529/3191	8529/3201
tta	gaa	gtt	ctc	aat	ttt	gat	ttt	caa	gca	aat	gca	caa	ctc	tca	aac	cct	aag	att	aat	cgg	ctg	gct	ctg	aag	gag	tca	gtg	aag	ttc	tcc	agc	aag	tac	ctg	aga	acg	gag	cat	ggg	
L	E	V	L	N	F	D	F	Q	A	N	A	N	A	L	S	N	P	K	I	N	P	L	A	L	K	E	S	V	K	F	S	K	Y	L	R	T	E	H	G	
8649/2841	8649/2851	8649/2861	8649/2871	8649/2881	8649/2891	8649/2901	8649/2911	8649/2921	8649/2931	8649/2941	8649/2951	8649/2961	8649/2971	8649/2981	8649/2991	8649/3001	8649/3011	8649/3021	8649/3031	8649/3041	8649/3051	8649/3061	8649/3071	8649/3081	8649/3091	8649/3101	8649/3111	8649/3121	8649/3131	8649/3141	8649/3151	8649/3161	8649/3171	8649/3181	8649/3191	8649/3201	8649/3211	8649/3221	8649/3231	8649/3241
agt	gaa	atg	ctg	ttt	ttt	ggg	aat	gct	att	gag	gga	aaa	tca	aac	aca	gtg	gca	agt	tta	caa	aca	gaa	aaa	aat	aca	ctg	gag	ctt	agt	aat	gga	gtg	att	gtc	aag	ata	aac	aat	cag	
S	E	M	L	F	G	N	A	I	E	G	K	S	N	T	V	A	S	L	H	T	E	K	N	T	L	E	L	S	N	G	V	I	V	K	I	N	N	Q		
8769/2881	8769/2891	8769/2901	8769/2911	8769/2921	8769/2931	8769/2941	8769/2951	8769/2961	8769/2971	8769/2981	8769/2991	8769/3001	8769/3011	8769/3021	8769/3031	8769/3041	8769/3051	8769/3061	8769/3071	8769/3081	8769/3091	8769/3101	8769/3111	8769/3121	8769/3131	8769/3141	8769/3151	8769/3161	8769/3171	8769/3181	8769/3191	8769/3201	8769/3211	8769/3221	8769/3231	8769/				

Fig 8 e

Fig 8f

SEQUENCE LISTING

<110> OBE THERAPY BIOTECHNOLOGY

<120> PROCEDE DE CRIBLAGE A HAUT DEBIT POUR L'IDENTIFICATION DE MOLECULES INHIBITRICES DE L'ACTIVITE D'ENZYMES D'EDITION

<130> B5864A - JAZ/LV/SDU

<140> PCT/FR 2005/XXXXXX

<141> 2005-05-23

<150> FR 0405753

<151> 2004-05-27

<160> 19

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 14121

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

attcccaccg ggacctgcgg ggctgagtgc ccttctcggg tgctgccgct gaggagcccg      60
cccagccagc cagggccgcg aggccgaggc caggccgcag cccaggagcc gccccaccgc      120
agctggcgat ggacccgcgg aggccgcgcg tgctggcgct gctggcgctg cctgcgctgc      180
tgctgctgct gctggcgggc gccagggccg aagaggaaat gctggaaaat gtcagcctgg      240
tctgtccaaa agatgcgacc cgattcaagc acctccggaa gtacacatac aactatgagg      300
ctgagagttc cagtggagtc cctgggactg ctgattcaag aagtgccacc aggatcaact      360
gcaaggttga gctggagggt cccagctctc gcagcttcat cctgaagacc agccagtgcg      420
ccctgaaaga ggtgtatggc ttcaaccctg agggcaaagc cttgctgaag aaaaccaaga      480
actctgagga gtttgcctgc gccatgtcca ggtatgagct caagctggcc attccagaag      540
ggaagcaggt ttctctttac ccggagaaaag atgaacctac ttacatcctg aacatcaaga      600
ggggcatcat ttctgccctc ctggttcccc cagagacaga agaagccaag caagtgttgt      660
ttctggatac cgtgtatgga aactgctcca ctactttac cgtcaagaag aggaagggca      720
atgtggcaac agaaatatcc actgaaagag acctggggca gtgtgatcgc ttcaagccca      780
tccgcacagg catcagccca cttgctctca tcaaaggcat gaccgcgccc ttgtcaactc      840
tgatcagcag cagccagtcc tgtcagtaca cactggacgc taagaggaag catgtggcag      900
aagccatctg caaggagcaa cacctcttcc tgcctttctc ctacaacaat aagtatggga      960
tggtagcaca agtgacacag actttgaaac ttgaagacac accaaagatc aacagccgct     1020
tctttgggtga aggtactaag aagatggggc tcgcatttga gagcaccaaa tccacatcac     1080

```


ctccaaagca ggccgaagct gttttgaaga ctctccagga actgaaaaaa ctaaccatct	1140
ctgagcaaaa tatccagaga gctaattctct tcaataagct ggttactgag ctgagaggcc	1200
tcagtgatga agcagtcaca tctctcttgc cacagctgat tgagggtgtcc agcccatca	1260
ctttacaagc cttggttcag tgtggacagc ctcagtgtc cactcacatc ctccagtggc	1320
tgaaacgtgt gcatgccaac cccctttctga tagatgtggc cacctacctg gtggccctga	1380
tccccgagcc ctcagcacag cagctgagc agatcttcaa catggcgagg gatcagcgca	1440
gccgagccac cttgtatgag ctgagccacg cgggtcaacaa ctatcataag acaaacccta	1500
cagggaacca ggagctgctg gacattgcta attacctgat ggaacagatt caagatgact	1560
gcactgggga tgaagattac acctatttga ttctgagggt cattggaaat atgggcaaaa	1620
ccatggagca gttaactcca gaactcaagt cttcaatcct caaatgtgtc caaagtacaa	1680
agccatcact gatgatccag aaagctgcca tccaggctct gcggaaaatg gagcctaaag	1740
acaaggacca ggaggttctt cttcagactt tccttgatga tgcttctccg ggagataagc	1800
gactggctgc ctatcttatg ttgatgagga gtccttcaca ggcagatatt aacaaaattg	1860
tccaaattct accatgggaa cagaatgagc aagtgaagaa ctttgtggct tcccatattg	1920
ccaatatctt gaactcagaa gaattggata tccaagatct gaaaaagtta gtgaaagaag	1980
ctctgaaaga atctcaactt ccaactgtca tggacttcag aaaattctct cggaactatc	2040
aactctacaa atctgtttct cttccatcac ttgaccagc ctcagccaaa atagaaggga	2100
atcttatatt tgatccaaat aactaccttc ctaaagaaag catgctgaaa actaccctca	2160
ctgcctttgg atttgcttca gctgacctca tcgagattgg cttggaagga aaaggctttg	2220
agccaacatt ggaagctctt tttgggaagc aaggattttt ccagacagc gtcaacaaag	2280
ctttgtactg ggttaatggc caagttcctg atgggtgtct taaggcttta gtggaccact	2340
ttggctatac caaagatgat aaacatgagc aggatatggc aaatggaata atgctcagt	2400
ttgagaagct gattaaagat ttgaaatcca aagaagtccc ggaagccaga gcctacctcc	2460
gcatcttggg agaggagctt ggttttgcca gtctccatga cctccagctc ctgggaaagc	2520
tgcttctgat ggggtgcccgc actctgcagg ggatcccca gatgattgga gaggtcatca	2580
ggaagggtc aaagaatgac ttttttcttc actacatctt catggagaat gcctttgaac	2640
tccccactgg agctggatta cagttgcaaa tatcttcac tcggagtcatt gctcccgag	2700
ccaaggctgg agtaaaactg gaagtagcca acatgcaggc tgaactgggt gcaaaaccct	2760
ccgtgtctgt ggagttttgt acaaatatgg gcatcatcat tccggacttc gctaggagt	2820
gggtccagat gaacaccaac ttcttcacg agtcgggtct ggaggctcat gttgccctaa	2880
aagctgggaa gctgaagttt atcattcctt ccccaaagag accagtcaag ctgctcagt	2940

gaggcaacac attacatttg gtctctacca ccaaaacgga ggtgatccca cctctcattg 3000
 agaacaggca gtcctgggtca gtttgcaagc aagtctttcc tggcctgaat tactgcacct 3060
 caggcgctta ctccaacgcc agctccacag actccgcctc ctactatccg ctgaccgggg 3120
 acaccagatt agagctggaa ctgaggccta caggagagat tgagcagtat tctgtcagcg 3180
 caacctatga gctccagaga gaggacagag ccttgggtgga taccctgaag tttgtaactc 3240
 aagcagaagg tgcgaagcag actgaggcta ccatgacatt caaatataat cggcagagta 3300
 tgaccttgtc cagtgaagtc caaattccgg attttgatgt tgacctcgga acaatcctca 3360
 gagttaatga tgaatctact gagggcaaaa cgtcttacag actcaccctg gacattcaga 3420
 acaagaaaat tactgaggtc gccctcatgg gccacctaag ttgtgacaca aaggaagaaa 3480
 gaaaaatcaa ggggtgttatt tccatacccc gtttgcaagc agaagccaga agtgagatcc 3540
 tcgcccactg gtgcctgcc aaactgcttc tccaaatgga ctcatctgct acagcttatg 3600
 gctccacagt ttccaagagg gtggcatggc attatgatga agagaagatt gaatttgaat 3660
 ggaacacagg caccaatgta gataccaaaa aaatgacttc caatttccct gtggatctct 3720
 ccgattatcc taagagcttg catatgtatg ctaatagact cctggatcac agagtccctg 3780
 aaacagacat gactttccgg cacgtgggtt ccaaattaat agttgcaatg agctcatggc 3840
 ttcagaaggc atctgggagt cttccttata ccagacttt gcaagaccac ctcaatagcc 3900
 tgaaggagtt caacctccag aacatgggat tgccagactt ccacatccca gaaaacctct 3960
 tcttaaaaag cgatggccgg gtcaaata ccttgaacaa gaacagtttg aaaattgaga 4020
 ttcctttgcc ttttggtggc aaatcctcca gagatctaaa gatgttagag actgttagga 4080
 caccagccct ccacttcaag tctgtgggat tccatctgcc atctogagag ttccaagtcc 4140
 ctacttttac cattcccaag ttgtatcaac tgcaagtgcc tctcctgggt gttctagacc 4200
 tctccacgaa tgtctacagc aacttgtaca actggtccgc ctctacagt ggtggcaaca 4260
 ccagcacaga ccatttcagc cttcgggctc gttaccacat gaaggctgac tctgtggttg 4320
 acctgcttcc ctacaatgtg caaggatctg gagaaacaac atatgaccac aagaatacgt 4380
 tcacactatc atgtgatggg tctctacgcc acaaatttct agattcgaat atcaaattca 4440
 gtcattgtaga aaaacttgga aacaaccag tctcaaaagg ttactaata ttogatgcat 4500
 ctagttcctg gggaccacag atgtctgctt cagttcattt ggactccaaa aagaaacagc 4560
 atttgtttgt caaagaagtc aagattgatg ggagttcag agtctcttcg ttctatgcta 4620
 aaggcacata tggcctgtct tgtcagaggg atcctaacac tggccggctc aatggagagt 4680
 ccaacctgag gtttaactcc tctacctcc aaggcaccaa ccagataaca ggaagatatg 4740

aagatggaac cctctccctc acctccacct ctgatctgca aagtggcatc attaaaaata	4800
ctgcttccct aaagtatgag aactacgagc tgactttaaa atctgacacc aatgggaagt	4860
ataagaactt tgccacttct aacaagatgg atatgacctt ctctaagcaa aatgcactgc	4920
tgcgttctga atatcaggct gattacgagt cattgagggt cttcagcctg ctttctggat	4980
cactaaattc ccatgggtctt gagttaaatg ctgacatctt aggcaactgac aaaattaata	5040
gtggtgctca caaggcgaca ctaaggattg gccagatgg aatatctacc agtgcaacga	5100
ccaacttgaa gtgtagtctc ctggtgctgg agaattgagct gaatgcagag cttggcctct	5160
ctggggcatc tatgaaatta acaacaaatg gccgcttcag ggaacacaat gcaaaattca	5220
gtctggatgg gaaagccgcc ctacagagc tatcactggg aagtgcttat caggccatga	5280
ttctgggtgt cgacagcaaa aacattttca acttcaagggt cagtcaagaa ggacttaagc	5340
tctcaaatga catgatgggc tcatatgctg aaatgaaatt tgaccacaca aacagtctga	5400
acattgcagg cttatcactg gacttctctt caaaacttga caacatttac agctctgaca	5460
agttttataa gcaaactggt aatttacagc tacagcccta ttctctggta actactttaa	5520
acagtgcctt gaaatacaat gctctggatc tcaccaacaa tgggaaacta cggctagaac	5580
ccctgaagct gcatgtggct ggtaacctaa aaggagccta ccaaaataat gaaataaaac	5640
acatctatgc catctcttct gctgccttat cagcaagcta taaagcagac actgttgcta	5700
aggttcaggg tgtggagttt agccatcggc tcaacacaga catcgctggg ctggcttcag	5760
ccattgacat gagcacaac tataattcag actcactgca tttcagcaat gtcttccgtt	5820
ctgtaatggc ccggtttacc atgaccatcg atgcacatac aaatggcaat gggaaactcg	5880
ctctctgggg agaacatact gggcagctgt atagcaaatt cctgttgaaa gcagaacctc	5940
tggcatttac tttctctcat gattacaaag gctccacaag tcatcatctc gtgtctagga	6000
aaagcatcag tgcagctctt gaacacaaag tcagtgcctt gcttactcca gctgagcaga	6060
caggcacctg gaaactcaag acccaattta acaacaatga atacagccag gacttggatg	6120
cttacaacac taaagataaa attggcgtgg agcttactgg acgaactctg gctgacctaa	6180
ctctactaga ctcccaatt aaagtgccac ttttactcag tgagcccatc aatatcattg	6240
atgctttaga gatgagagat gccgttgaga agccccaaga atttacaatt gttgcttttg	6300
taaagtatga taaaaaccaa gatgttctact ccattaacct cccatttttt gagaccttgc	6360
aagaatattt tgagaggaat cgacaaacca ttatagttgt agtggaaaac gtacagagaa	6420
acctgaagca catcaatatt gatcaatttg taagaaaata cagagcagcc ctgggaaaac	6480
tcccacagca agctaattgat tatctgaatt cattcaattg ggagagacaa gtttcacatg	6540
ccaaggagaa actgactgct ctacaaaaa agtatagaat tacagaaaat gatatacaaa	6600

ttgcattaga	tgatgccaaa	atcaacttta	atgaaaaact	atctcaactg	cagacatata	6660
tgatacaatt	tgatcagtat	attaaagata	gttatgattt	acatgatttg	aaaatagcta	6720
ttgctaatat	tattgatgaa	atcattgaaa	aattaaaaag	tcttgatgag	cactatcata	6780
tccgtgtaaa	tttagtaaaa	acaatccatg	atctacattt	gtttattgaa	aatattgatt	6840
ttaacaaaag	tggaagtagt	actgcatcct	ggattcaaaa	tgtggatact	aagtaccaa	6900
tcagaatcca	gatacaagaa	aaactgcagc	agcttaagag	acacatacag	aatatagaca	6960
tccagcacct	agctggaaag	ttaaaacaac	acattgaggc	tattgatggt	agagtgcctt	7020
tagatcaatt	gggaactaca	atttcatttg	aaagaataaa	tgatgttctt	gagcatgtca	7080
aacactttgt	tataaatctt	attggggatt	ttgaagtagc	tgagaaaatc	aatgccttca	7140
gagccaaagt	ccatgagtta	atcgagaggt	atgaagtaga	ccaacaaatc	cagggtttta	7200
tggtataaatt	agtagagttg	acccaccaat	acaagttgaa	ggagactatt	cagaagctaa	7260
gcaatgtcct	acaacaagtt	aagataaaaag	attactttga	gaaattgggt	ggatttattg	7320
atgatgctgt	gaagaagctt	aatgaattat	cttttaaaac	attcattgaa	gatgttaaca	7380
aattccttga	catgttgata	aagaaattaa	agtcatttga	ttaccaccag	tttgtagatg	7440
aaaccaatga	caaaatccgt	gaggtgactc	agagactcaa	tggtgaaatt	caggctctgg	7500
aactaccaca	aaaagctgaa	gcattaaaac	tgttttttaga	ggaaaccaag	gccacagttg	7560
cagtgtatct	ggaaagccta	caggacacca	aaataacctt	aatcatcaat	tggttacagg	7620
aggctttaag	ttcagcatct	ttggctcaca	tgaaggccaa	attccgagag	actctagaag	7680
atacacgaga	cogaatgtat	caaattggaca	ttcagcagga	acttcaacga	tacctgtctc	7740
tggtaggcca	ggtttatagc	acacttgtca	cctacatttc	tgattgggtg	actcttgctg	7800
ctaagaacct	tactgacttt	gcagagcaat	attctatcca	agattgggct	aaacgtatga	7860
aagcattggg	agagcaaggg	ttcactgttc	ctgaaatcaa	gaccatcctt	gggaccatgc	7920
ctgcctttga	agtcagtctt	caggctcttc	agaaagctac	cttccagaca	cctgatttta	7980
tagtccccct	aacagatttg	aggattccat	cagttcagat	aaacttcaaa	gacttaaaaa	8040
atataaaaaat	cccatccagg	ttttccacac	cagaattttac	catccttaac	accttcaca	8100
ttccttcctt	tacaattgac	tttgtcgaaa	tgaaagtaaa	gatcatcaga	accattgacc	8160
agatgcagaa	cagtgagctg	cagtggcccg	ttccagatat	atatctcagg	gatctgaagg	8220
tgaggacat	tcctctagcg	agaatcacc	tgccagactt	cgtttacca	gaaatcgcaa	8280
ttccagaatt	cataatccca	actctcaacc	ttaatgattt	tcaagttcct	gaccttcaca	8340
taccagaatt	ccagcttccc	cacatctcac	acacaattga	agtacctact	tttggcaagc	8400

tatacagtat tctgaaaatc caatctcctc ttttcacatt agatgcaa at gctgacatag	8460
ggaatggaac cacctcagca aacgaagcag gtatcgagc ttccatcact gccaaaggag	8520
agtccaaatt agaagttctc aattttgatt ttcaagcaaa tgcacaactc tcaaacccta	8580
agattaatcc gctggctctg aaggagtcag tgaagttctc cagcaagtac ctgagaacgg	8640
agcatgggag tgaaatgctg ttttttgaa atgctattga gggaaaatca aacacagtgg	8700
caagttttaca cacagaaaaa aatacactgg agcttagtaa tggagtgtt gtcaagataa	8760
acaatcagct taccctggat agcaacacta aatacttcca caaattgaac atccccaac	8820
tggacttctc tagtcaggct gacctgogca acgagatcaa gacactgttg aaagctggcc	8880
acatagcatg gacttcttct ggaaaagggt catggaaatg ggctgcccc agattctcag	8940
atgagggaa acatgaatca caaattagtt tcaccataga aggaccctc acttcctttg	9000
gactgtccaa taagatcaat agcaaacacc taagagtaaa ccaaaacttg gtttatgaat	9060
ctggctccct caacttttct aaacttgaaa ttcaatcaca agtcgattcc cagcatgtgg	9120
gccacagtgt tctaactgct aaaggcatgg cactgttttg agaagggaag gcagagtta	9180
ctgggaggca tgatgctcat ttaaattgaa aggttatttg aactttgaaa aattctcttt	9240
tcttttcagc ccagccattt gagatcacgg catccacaaa caatgaagg aatttgaaag	9300
ttcgttttcc attaagggtta acagggaaga tagacttct gaataactat gcaactgttc	9360
tgagtcccag tgcccagcaa gcaagttggc aagtaagtgc taggttcaat cagtataagt	9420
acaacaaaaa tttctctgct ggaaacaacg agaacattat ggaggcccat gtaggaataa	9480
atggagaagc aaatctggat ttcttaaaca ttcctttaac aattcctgaa atgctctac	9540
cttacacaat aatcacaact cctccactga aagatttctc tctatgggaa aaaacaggct	9600
tgaaggaatt cttgaaaacg acaaagcaat catttgattt aagtgtaaaa gctcagtata	9660
agaaaaacaa acacaggcat tccatcacia atcctttggc tgtgctttgt gagtttatca	9720
gtcagagcat caaatccttt gacaggcatt ttgaaaaaaa cagaaacaat gcattagatt	9780
ttgtcaccaa atcctataat gaaacaaaaa ttaagtttga taagtacaaa gctgaaaaat	9840
ctcacgacga gctcccagg acctttcaaa ttcctggata cactgttcca gttgtcaatg	9900
ttgaagtgtc tccattcacc atagagatgt oggcattcgg ctatgtgttc caaaagcag	9960
tcagcatgcc tagtttctcc atcctaggtt ctgacgtccg tgtgccttca tacacattaa	10020
tcctgccatc attagagctg ccagtcttc atgtccctag aaatctcaag ctttctcttc	10080
cacatttcaa ggaattgtgt accataagcc atatttttat tcctgccatg ggcaatatta	10140
cctatgattt ctcttttaa tcaagtgtca tcacactgaa taccaatgct gaacttttta	10200
accagtcaga tattgttgct catctccttt ctcatcttc atctgtcatt gatgcactgc	10260

agtacaaatt agagggcacc acaagattga caagaaaaag gggattgaag ttagccacag 10320
 ctctgtctct gagcaacaaa tttgtggagg gtagtcataa cagtactgtg agcttaacca 10380
 cgaaaaatat ggaagtgtca gtggcaaaaa ccacaaaagc cgaaattcca attttgagaa 10440
 tgaatttcaa gcaagaactt aatggaaata ccaagtcaaa acctactgtc tcttctcca 10500
 tggaatttaa gtatgatttc aattcttcaa tgctgtactc taccgctaaa ggagcagttg 10560
 accacaagct tagcttgaa agcctcacct cttacttttc cattgagtca tctaccaaag 10620
 gagatgtcaa gggttcgggt ctttctcggg aatattcagg aactattgct agtgaggcca 10680
 acacttactt gaattccaag agcacacggt cttcagtga gctgcagggc acttccaaaa 10740
 ttgatgatat ctggaacctt gaagtaaaag aaaattttgc tggagaagcc acactccaac 10800
 gcataatatt cctctgggag cacagtacga aaaaccactt acagctagag ggccctctttt 10860
 tcaccaacgg agaacataca agcaaagcca ccctggaact ctctccatgg caaatgtcag 10920
 ctcttgttca ggtccatgca agtcagccca gttccttcca tgatttcctt gaccttggcc 10980
 aggaagtggc cctgaatgct aacactaaga accagaagat cagatggaaa aatgaagtcc 11040
 ggattcatte tgggtctttc cagagccagg tcgagctttc caatgaccaa gaaaaggcac 11100
 accttgacat tgcaggatcc ttagaaggac acctaaagggt cctcaaaaat atcatcctac 11160
 cagtctatga caagagctta tgggatttcc taaagctgga tgtaaccacc agcattggta 11220
 ggagacagca tcttcgtgtt tcaactgcct ttgtgtacac caaaaacccc aatggctatt 11280
 cattctccat ccctgtaaaa gttttggctg ataaattcat tactcctggg ctgaaactaa 11340
 atgatctaaa ttcagttctt gtcatgccta cgttccatgt cccatttaca gatcttcagg 11400
 ttccatcgtg caaacttgac ttcagagaaa tacaatcta taagaagctg agaacttcat 11460
 catttgccct caacctacca acactccccg aggtaaaatt ccctgaagtt gatgtgttaa 11520
 caaaatattc tcaaccagaa gactccttga ttcccttttt tgagataacc gtgcctgaat 11580
 ctcagttaac tgtgtcccag ttcacgcttc caaaaagtgt ttcagatggc attgctgctt 11640
 tggatctaaa tgcagtagcc aacaagatcg cagactttga gttgcccacc atcatcgtgc 11700
 ctgagcagac cattgagatt ccctccatta agttctctgt acctgctgga attgtcattc 11760
 cttcctttca agcactgact gcacgctttg aggtagactc tcccgtgtat aatgccactt 11820
 ggagtgccag tttgaaaaac aaagcagatt atgttgaaac agtcctggat tccacatgca 11880
 gctcaaccgt acagttccta gaatatgaac taaatgtttt gggaacacac aaaatcgaag 11940
 atggtacgtt agcctctaag actaaaggaa cacttgacac ccgtgacttc agtgcagaat 12000
 atgaagaaga tggcaaattt gaaggacttc aggaatggga aggaaaagcg cacctcaata 12060

tcaaaagccc agcggttcacc gatctccatc tgcgctacca gaaagacaag aaaggcatct 12120
ccacctcagc agcctcccca gccgtaggca ccgtgggcat ggatatggat gaagatgacg 12180
acttttctaa atggaacttc tactacagcc ctcatctctc tccagataaa aaactcacca 12240
tattcaaaac tgagttgagg gtccgggaat ctgatgagga aactcagatc aaagttaatt 12300
gggaagaaga ggcagcttct ggcttgctaa cctctctgaa agacaacgtg cccaaggcca 12360
caggggtcct ttatgattat gtcaacaagt accactggga acacacaggg ctaccctga 12420
gagaagtgtc ttcaaagctg agaagaaatc tgcagaacaa tgctgagtgg gtttatcaag 12480
gggccattag gcaaattgat gatatcgacg tgaggttcca gaaagcagcc agtggcacca 12540
ctgggacctc ccaagagtgg aaggacaagg ccagaaatct gtaccaggaa ctggtgactc 12600
aggaaggcca agccagtttc cagggactca aggataacgt gtttgatggc ttggtaacgag 12660
ttactcaaaa attccatag aaagtcaagc atctgattga ctactcatt gattttctga 12720
acttccccag attccagttt ccggggaaac ctgggatata cactaggagag gaactttgca 12780
ctatgttcat aaggagagta gggacggtac tgtcccaggt atattcgaaa gtccataatg 12840
gttcagaaat actgttttcc tatttccaag acctagtgat tacacttctt ttcgagttaa 12900
ggaaacataa actaatagat gtaatctcga tgtataggga actgttgaaa gatttatcaa 12960
aagaagccca agaggtatct aaagccattc agtctctcaa gaccacagag gtgctacgta 13020
atcttcagga ctttttacia ttcatcttcc aactaataga agataacatt aaacagctga 13080
aagagatgaa atttacttat cttattaatt atatccaaga tgagatcaac acaatcttca 13140
atgattatat cccatatgtt tttaaattgt tgaaagaaaa cctatgcctt aatcttcata 13200
agttcaatga atttattcaa aacgagcttc aggaagcttc tcaagagtta cagcagatcc 13260
atcaatacat tatggccctt cgtgaagaat attttgatcc aagtatagtt ggctggacag 13320
tgaaatatta tgaacttgaa gaaaagatag tcagtctgat caagaacctg ttagttgctc 13380
ttaaggactt ccattctgaa tatattgtca gtgcctctaa ctttacttcc caactctcaa 13440
gtcaagttga gcaatttctg cacagaaata ttcaggaata tcttagcatc cttaccgatc 13500
cagatggaaa agggaaagag aagattgcag agctttctgc cactgctcag gaaataatta 13560
aaagccaggc cattgcgacg aagaaaataa tttctgatta ccaccagcag tttagatata 13620
aactgcaaga tttttcagac caactctctg attactatga aaaatttatt gctgaatcca 13680
aaagattgat tgacctgtcc attcaaaact accacacatt tctgatatac atcacggagt 13740
tactgaaaaa gctgcaatca accacagtca tgaaccctca catgaagctt gctccaggag 13800
aacttactat catcctctaa ttttttaaaa gaaatcttca tttattcttc ttttccaatt 13860
gaactttcac atagcacaga aaaaattcaa actgcctata ttgataaaaac catacagtga 13920

gccagccttg cagtaggcag tagactataa gcagaagcac atatgaactg gacctgcacc 13980
 aaagctggca ccagggctcg gaaggtctct gaactcagaa ggatggcatt ttttgcaagt 14040
 taaagaaaat caggatctga gttattttgc taaacttggg ggaggaggaa caataaatg 14100
 gagtctttat tgtgtatcat a 14121

<210> 2
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> artificial: primer

<400> 2
 gagatctgtg agcaagggcg aggagc 26

<210> 3
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> artificial: primer

<400> 3
 gccgcggtt gtacagctcg tccatgc 27

<210> 4
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> artificial: primer

<400> 4
 gagatctgtc accgacgcc aaaaacata 28

<210> 5
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> artificial: primer

<400> 5
 gccgcggcac ggcatcttt ccgcc 26

<210> 6
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> artificial: primer

<400> 6
 gagatctcac ccagaaacgc tggtgaa 27

<210> 7
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> artificial: primer

<400> 7

gccgcggcca atgcttaatc agtgag

26

<210> 8
<211> 31
<212> DNA
<213> artificial: primer

<400> 8
gccgcggaat tcattcaatt gggagagaca a

31

<210> 9
<211> 31
<212> DNA
<213> artificial: primer

<400> 9
ggtcgacact acttcactt ttgttaaaat c

31

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial: primer

<400> 10
gcatctgact gggagagaca ag

22

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial: primer

<400> 11
ggatatgata ctgttcgtca agc

23

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial: primer

<400> 12
aagaaaatac agagcagccc t

21

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial: primer

<400> 13
gtgctggatg tctatattct g

21

<210> 14
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial: primer

<400> 14
aaagggcaag gagtgtggc 19

<210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial: primer

<400> 15
aagaccccaa cgagaagc 18

<210> 16
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial: primer

<400> 16
ggcaactatg gatgaacg 18

<210> 17
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial: primer

<400> 17
ccaagaaggg cggaaaga 18

<210> 18
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial: primer

<400> 18
aagtagctgg tgccaagga 19

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial: primer

<400> 19
cacggatatg atagtgctca t 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/001288

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/62 C12Q1/68 C12N15/63 C12N15/12 C12N5/10
G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BOSTROM K ET AL: "APOLIPOPROTEIN B48 RNA EDITING IN CHIMERIC APOLIPOPROTEIN EB MESSENGER RNA" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 26, 1989, pages 15701-15708, XP002299795 ISSN: 0021-9258 page 15703, right-hand column, last paragraph - page 15705, left-hand column, paragraph 2 figures 1,4</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-6,8-16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 October 2005

Date of mailing of the international search report

07/11/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Seroz, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2005/001288

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LELLEK HEINRICH ET AL: "Reconstitution of mRNA editing in yeast using a Gal4-ApoB-Gal80 fusion transcript as the selectable marker" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 26, 28 June 2002 (2002-06-28), pages 23638-23644, XP002299796 ISSN: 0021-9258 figure 1 -----	1-16
A	FR 2 762 014 A (HAROSH ITZIK) 16 October 1998 (1998-10-16) cited in the application -----	
A	W0 99/35257 A (HAROSH ITZIK) 15 July 1999 (1999-07-15) cited in the application -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2005/001288

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
FR 2762014	A	16-10-1998	AU	7055098 A		30-10-1998
			WO	9845472 A1		15-10-1998
			US	6210888 B1		03-04-2001
<hr/>						
WO 9935257	A	15-07-1999	AT	278014 T		15-10-2004
			AU	1971399 A		26-07-1999
			DE	69826717 D1		04-11-2004
			EP	1042463 A1		11-10-2000
			FR	2773079 A1		02-07-1999
<hr/>						

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2005/001288

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N15/62 C12Q1/68 C12N15/63 C12N15/12 C12N5/10 G01N33/68		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N C12Q G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, Sequence Search, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BOSTROM K ET AL: "APOLIPOPROTEIN B48 RNA EDITING IN CHIMERIC APOLIPOPROTEIN EB MESSENGER RNA" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 26, 1989, pages 15701-15708, XP002299795 ISSN: 0021-9258 page 15703, colonne de droite, dernier alinéa - page 15705, colonne de gauche, alinéa 2 figures 1,4 <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">----- -/--</div>	1-6, 8-16
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
° Catégories spéciales de documents cités:		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
12 octobre 2005		07/11/2005
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale		Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Seroz, T

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	LELLEK HEINRICH ET AL: "Reconstitution of mRNA editing in yeast using a Gal4-ApoB-Gal80 fusion transcript as the selectable marker" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 26, 28 juin 2002 (2002-06-28), pages 23638-23644, XP002299796 ISSN: 0021-9258 figure 1	1-16
A	FR 2 762 014 A (HAROSH ITZIK) 16 octobre 1998 (1998-10-16) cité dans la demande	
A	WO 99/35257 A (HAROSH ITZIK) 15 juillet 1999 (1999-07-15) cité dans la demande	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2005/001288

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
FR 2762014	A	16-10-1998	AU	7055098 A	30-10-1998
			WO	9845472 A1	15-10-1998
			US	6210888 B1	03-04-2001
<hr/>					
WO 9935257	A	15-07-1999	AT	278014 T	15-10-2004
			AU	1971399 A	26-07-1999
			DE	69826717 D1	04-11-2004
			EP	1042463 A1	11-10-2000
			FR	2773079 A1	02-07-1999
<hr/>					